Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen über das fetale und placentare Wachstum in Abhängigkeit von Implantationsort, Resorptionen, Anzahl der Implantationen und uteriner Blutversorgung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johannes Epping
aus Berlin

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547025_0055

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen über das fetale und placentare Wachstum in Abhängigkeit von Implantationsort, Resorptionen, Anzahl der Implantationen und uteriner Blutversorgung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johannes Epping
aus Berlin

Referent: Professor Dr.med. Diether Neubert

Korreferent: Professor Dr.med. Elisabeth Köhler

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 28.Juni 1972

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Unterschiede zwischen Tier und Mensch, die bei teratologischen Untersuchungen zu berücksichtigen sind	1
1.2.	Literaturübersicht über uterine Faktoren, die die intrauterine Entwicklung beeinflussen können	2
1.2.1.	Abhängigkeit der embryonalen Entwicklung von Unterschieden und Wechselwirkungen zwischen den beiden Uterushörnern	2
1.2.2.	Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Anzahl der Implantationen im Uterus	5
1.2.3.	Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Anzahl der Implantationen im Horn	7
1.2.4.	Abhängigkeit der intrauterinen Entwicklung vom Implantationsort	8
1.3.	Eigene Fragestellung	9
2.	METHODEN UND MATERIAL	10
2.1.	Tierhaltung	10
2.2.	Operation	11
2.3.	Radioaktive Markierung des mütterlichen Serums in-vivo	12
2.4.	Bestimmung der Radioaktivität im mütterlichen Serum und in verschiedenen embryonalen und placentaren Zellkomponenten	13
2.4.1.	Präparation der Gewebe	13
2.4.2.	Bestimmung der Radioaktivität im mütterlichen Serum	15
2.4.3.	Fraktionierung der einzelnen Embryonen und Placenten in verschiedene Zellkomponenten	15
2.4.3.1.	Fraktionierte Säure-Laugen-Extraktion, modifiziert nach KROWKE	15
2.4.3.2.	Verkürzte Säure-Laugen-Extraktion	18
2.4.3.3.	Vergleich der beiden Fraktionierungsmethoden	22
2.4.4.	Reinheit der verschiedenen Fraktionen	25
2.4.5.	Messung der Radioaktivität	25
2.5.	Bestimmung des DNA-Gehalts	27
2.6.	Elektronenmikroskopische Technik	27
2.7.	Teratologische Technik	28
2.8.	Nomenklatur der intrauterinen Positionen	29
2.9.	Statistische Auswertung	29

		Seite
3.	BEEINFLUSSUNG DES WACHSTUMS UND DER ENTWICKLUNG VON RATTENEMBRYONEN NACH OPERATIVER UNTERBINDUNG DER UTERINEN GEFÄSSE ERGEBNISSE UND DISKUSSION	29
3.1.	Wirkung von Pentobarbital auf das fetale Wachstum	29
3.2.	Ausmaß und Reihenfolge der fetalen Letalität nach Unterbindung der uterinen Gefäße	31
3.3.	Auswirkung der Ligatur auf Gewicht und DNA-Gehalt von Fet und Placenta	35
3.3.1.	Auswirkung der Ligation auf den fetalen DNA-Gehalt	40
3.3.2.	Auswirkung der Ligation auf das fetale Gewicht	40
3.3.3.	Wachstum der Placenta nach Unterbindung der uterinen Gefäße	43
3.4.	Aufnahme von ^{14}C-Glukose in embryonale und placentare Zellkomponenten	43
3.4.1.	Einbau von ^{14}C-Glukose in embryonales bzw. fetales Gewebe	46
3.4.2.	Einbau von ^{14}C-Glukose-Metaboliten in placentares Gewebe	50
3.5.	Feinstruktur von Embryo und Placenta am Tag 13 nach Ligation der uterinen Gefäße	54
3.5.1.	Normale Feinstruktur des Embryo am Tag 13	54
3.5.2.	Die embryonale Feinstruktur am Tag 13 nach Ligation der uterinen Gefäße	55
3.5.3.	Die normale placentare Feinstruktur am Tag 13	55
3.5.4.	Die placentare Feinstruktur nach Ligation der uterinen Gefäße am Tag 13	56
3.5.5.	Veränderungen der Feinstruktur und ihre biochemische Funktion	56
3.6.	Teratologische Untersuchungen	62
3.7.	Zusammenfassende Diskussion des zeitlichen Ablaufs embryotoxischer Effekte nach Unterbindung der uterinen Gefäße	64
4.	EINFLUSS UTERINER FAKTOREN AUF DAS WACHSTUM VON RATTEN-EMBRYONEN ERGEBNISSE UND DISKUSSION	67
4.1.	Vergleich der beiden Uterushörner und ihre gegenseitige Beeinflussung	67
4.1.1.	Anzahl der Implantation	67
4.1.2.	Zahl der Resorptionen	70
4.1.3.	^{14}C-Glukose Einbau	70
4.1.4.	Diskussion	70

Seite

4.2.1.	Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Implantationszahl im Tier	73
4.2.1.1.	Resorptionsrate	73
4.2.1.2.	^{14}C-Glukose-Einbau, DNA-Gehalt	77
4.2.1.3.	Diskussion	77
4.2.2.	Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Zahl der Implantationen im Horn	78
4.2.2.1.	Resorptionsrate	78
4.2.2.2.	^{14}C-Glukose-Einbau	78
4.3.	Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von Resorptionsvorgängen	83
4.4.	Abhängigkeit der intrauterinen Entwicklung vom Implantationsort	86
4.4.1.	Untersuchungen am Tag 13	86
4.4.2.	Untersuchungen am Tag 20	88
4.4.3.	Diskussion	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG	97
6.	LITERATURVERZEICHNIS	101

1. EINLEITUNG

1.1. UNTERSCHIEDE ZWISCHEN TIER UND MENSCH, DIE BEI TERATOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZU BERÜCKSICHTIGEN SIND

Beim Menschen tritt Unreife und intrauterine Wachstumsverzögerung signifikant häufiger bei Mehrlingsgeburten auf (ANDERSON und LYON 1939, CHURCHILL 1965, DONALD und PURSER 1956, GRUENWALD 1961, KINDRED 1944, LOVE und KINCH 1965). Zwischen"Einlingen", Zwillingen, Drillingen und Vierlingen besteht nach NAEYE und Mitarbeitern (1964, 1966) bis zur 24. und nach McKEOWN und RECORD (1953) bis zur 27. Woche der Schwangerschaft kein Unterschied im mittleren Gewicht. Gegenüber Einlingen (McKEOWN und RECORD 1953) verringert sich die Gewichtszunahme der Vierlinge ab der 27. Woche der Schwangerschaft, der Drillinge ab der 28. Woche und der Zwillinge ab der 30. Woche. Zwischen der 24. und 36. Woche ist die Gewichtszunahme bei Einlingen konstant; danach wachsen auch Einlinge von Woche zu Woche langsamer. Diese Wachstumsverlangsamung tritt jeweils auf bei einem Gesamtfetalgewicht von 3,5 kg, welches bei Vierlingen die Summe der Gewichte von vier Feten darstellt und bei Einlingen dem Fetalgewicht entspricht. Die Überlebenschance eines Neugeborenen ist abhängig vom Geburtsgewicht (BERG und YERUSHALMY 1966). Vergleicht man Gruppen gleichen niedrigen Geburtsgewichtes, so zeigt sich, daß kleine Neugeborene aus Mehrlingsgeburten bessere Überlebenschancen haben als gleich schwere Einlinge. Die intrauterine Wachstumsverzögerung in Mehrlingsgeburten unterscheidet sich also in ihren Auswirkungen von Einlingsgeburten.

Aufgrund der Unterschiede in intrauteriner Wachstumskinetik, Geburtsgewicht, Mißbildungshäufigkeit und Überlebenschancen werden bei Untersuchungen menschlicher Feten und neugeborener Einlinge und Mehrlinge getrennt aufgeführt. Bei teratologischen Untersuchungen ist man in großem Umfange auf Tierexperimente angewiesen. Hierbei ein bevorzugtes Objekt sind die Nager, ins-

besondere die Ratte und die Maus. Die Nager sind im Gegensatz zum Menschen polytoke Tiere. Als weiteren Unterschied weisen sie einen Uterus bicornis auf. Für den Menschen wurden anfangs die Wechselwirkungen zwischen Feten in einem gemeinsamen Uterus erwähnt. Aufgabe dieser Arbeit ist es, den unterschiedlichen Einfluß eines Muttertieres auf die in seinem Uterus geborgenen Feten, die Wechselbeziehung dieser Feten untereinander, und die mütterliche Belastung durch eine unterschiedliche Implantationszahl im Laufe der Schwangerschaft - insbesondere in der störungsanfälligsten Phase, der Organogenese - zu untersuchen.

Das mittelbare Organ für die Wechselwirkungen zwischen Mutter und Fet sowie Fet und Fet ist der Uterus. Uterine Faktoren, die während und nach der Differenzierungsphase das individuelle Schicksal von Feten polytoker Tiere beeinflussen könnten und deren Einwirkung zumeist auf das Geburtsgewicht der Feten oder der Placenta an verschiedenen Spezies nachgewiesen ist, sind folgende:

1) Unterschiede zwischen den beiden Uterus-Hörnern
2) Die Anzahl von Implantationen in einem Uterus
3) Die Anzahl von Implantationen in einem Uterus-Horn
4) Die Wirkung von Resorptionen auf den Uterus und die in ihm überlebenden Feten
5) Der Implantationsort in einem Uterus-Horn

1.2. LITERATURÜBERSICHT ÜBER UTERINE FAKTOREN, DIE DIE INTRAUTERINE ENTWICKLUNG BEEINFLUSSEN KÖNNEN

Zu den genannten uterinen Faktoren sollen im folgenden die Ergebnisse früherer Autoren kurz referiert und die sich daraus ergebenden Probleme angesprochen werden.

1.2.1. Abhängigkeit der embryonalen Entwicklung von Unterschieden und Wechselwirkungen zwischen den beiden Uterushörnern

McLAREN und MITCHIE (1963) finden ($p = 0{,}02$) bei der Maus und BARR und Mitarbeiter (1970) bei der Ratte eine größere Implantationszahl (ca. 5 %) rechts als links. Ob diese Unterschiede bedingt sind

durch einen größeren Eiausstoß des rechten Ovars, eine höhere Zahl von corpora lutea im rechten Uterus oder eine schlechtere Implantationsrate im linken Uterus, ist nicht untersucht. Eine Erklärung für diese Unterschiedlichkeit zwischen den Uterushörnern kann nicht gegeben werden. Es liegen auch keine Anhaltspunkte dafür vor, diese Seitenunterschiede auf den unterschiedlichen Ursprungsort der arteria ovarica zurückzuführen: die arteria ovarica entspringt links aus der arteria renalis und rechts aus der Aorta direkt (Abb. 1).

Die Zahl von Implantationen, die in korrespondierenden Uterushörnern gefunden wird, ist in der Regel unterschiedlich. Zwischen der Zahl der Implantationen in den beiden Uterushörnern finden HOLLANDER und STRONG (1950), RUNNER (1951), BOWMANN und ROBERTS (1958) sowie BARR und Mitarbeiter (1971) eine negative Korrelation. DANFORTH und ABERLE (1928) sowie McLAREN und MITCHI (1963) fanden im Eiausstoß eine negative Korrelation; da die Hörner, die mehr corpora lutea aufwiesen, auch einen größeren Präimplantationsverlust zeigten, konnten DANFORTH und ABERLE sowie McLAREN und MITCHI keine Korrelation in der Implantationszahl nachweisen. Da der Präimplantationsverlust ebenfalls negativ korreliert war, konnte in der Implantationszahl keine Korrelation gefunden werden. Eine "positive" Korrelation kann durch die Gabe von Gonadotropinen provoziert werden (McLAREN). Nach ECKSTEIN und McKEOWN (1955a), HASHIMA (1956), FALCONER et al. (1961) ist die Korrelation der Implantationszahl zwischen den Uterushörnern jeweils bedingt durch eine entsprechende Korrelation der Ovulationsrate in den beiden Ovarien. Die Dauer eines ovulationswirksamen FSH-Spiegels der mit zunehmender Ovulationszahl und damit mit zunehmender hormonaler Gegenregulation durch die corpora lutea (NEUMANN 1970) verringert wird, begrenzt die Gesamtzahl an Ovulationen, wobei ungeklärt bleibt, warum die Zahl der Ovulationen in einem Ovar zu einem bestimmten Zeitpunkt wahrscheinlicher ist als im anderen.

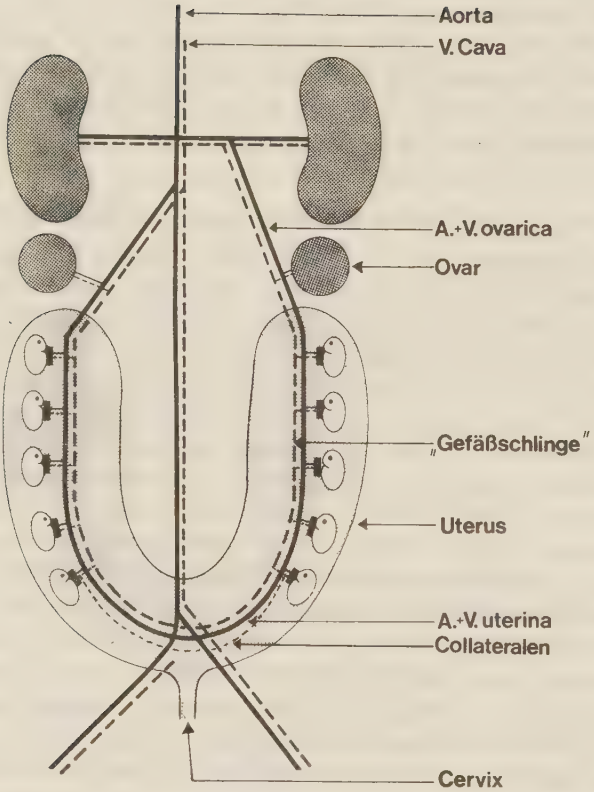

Abbildung 1

Gefäßversorgung im Uterus bicornis

1.2.2. Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Anzahl der Implantationen im Uterus

In zahlreichen Untersuchungen verschiedener Tierarten wurde nachgewiesen, daß sich mit zunehmender Wurfzahl das Geburtsgewicht der einzelnen Feten verringert. In Tab.1 sind einige Autoren aufgeführt. Beim Vergleich dieser Untersuchungen fällt auf, daß Tiere mit einer relativ längeren Tragzeit eine größere Abhängigkeit des Geburtsgewichtes von der Implantationszahl aufweisen. Wenn auch der Unterschied im Geburtsgewicht bei Ratte und Maus zwischen Tieren mit extrem hohen (18 Implantationen im Tier, mittleres Fetalgewicht 5,8 g) und extrem niedrigen Implantationzahlen (2 Implantationen im Tier, mittleres Fetalgewicht 1,2 g) deutlich ist, so erscheint es doch fragwürdig, eine lineare Abhängigkeit anzunehmen, zumal wir, wenn man die Daten von JENSH und Mitarbeiter nachrechnet, zwischen Tieren 5, 6, 7, 13, 14 und 15 Implantationen keine Unterschiede finden konnten. Nach den vorliegenden Untersuchungen erscheint uns ein plateauartiger Verlauf der Abhängigkeit des Geburtsgewichtes von der Implantationszahl wahrscheinlicher als der lineare, wobei sich für extrem niedrige Implantationszahlen ein höheres und für extrem hohe Implantationszahlen ein niedrigeres mittleres Fetalgewicht ergibt, das Geburtsgewicht aber in einem für jedes Tier zu definierenden Bereich unabhängig von der Implantationszahl ist.

Die meisten Autoren führen die Abhängigkeit des Wachstums von der Wurfgröße auf eine begrenzte Ernährungsmöglichkeit der Mutter zurück. Wenn diese Ernährungsmöglichkeit überschritten würde, käme es zu einer intrauterinen Wachstumsverzögerung. Besonders deutlich wird dieses Mißverhältnis zwischen Angebot und Nachfrage in der post-natalen Periode. Deswegen schlagen einige Autoren (z.B. PARK 1968, 1971) vor, post-natal der Mutter nur eine begrenzte Zahl von Neugeborenen zu belassen.

In der hämotrophen Phase der intrauterinen Entwicklung sorgt die Placenta für den Stoffaustausch zwischen Muttertier und Fet.

Tabelle 1

Fetales Geburtsgewicht in Abhängigkeit von der Wurfgröße

Literaturübersicht

Maus	Healy et al.	1961
	McCarthy	1967
	McLaren	1965
Ratte	King	1915
	Barr et al.	1970 c
	Jensh et al.	1970
Meerschweinchen	Minot	1891
	Wright	1922
	Ibsen	1928
	Eckstein	1955 a, b
Kaninchen	Hammond	1921, 1934
	Kopec	1924
Schwein	Carmichael	1920
Schaf	Hammond	1932
	Winters, Feuffel	1936
	Philipps, Dawson	1940
	Barcroft, Kennedy	1939
	Barcroft	1944
Mensch	Westermark	1926
	Guttmacher	1939
	Daiser	1939
	Potter, Crunden	1941
	Mazzullo	1948
	Potter, Fuller	1949
	McKeown, Record	1952

Ähnlich wie der Fet zeigt auch die Placenta in ihrem Wachstum eine Abhängigkeit von der Wurfgröße. Ihr Wachstum und damit ihre Möglichkeit, den Embryo zu ernähren, kann begrenzend sein für das fetale Wachstum, was insbesondere in Untersuchungen über die Placentafusionen deutlich wird. Bei Placentafusionen werden wenigstens zwei Feten von einer gemeinsamen Placenta versorgt. Die Placentafusion (McLAREN und MICHIE 1959) führt zu einer Geburtsgewichtsverminderung der angeschlossenen Feten. Wird einer der beiden Feten resorbiert, erreicht der allein verbleibende Fet ein normales Geburtsgewicht. Wahrscheinlich durch die Raumenge bedingt, finden sich diese Placentafusionen in Tieren mit hoher Implantationszahl häufiger.

1.2.3. Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Anzahl der Implantationen im Horn

Wie für die Implantationszahl im Tier konnte eine Reihe von Autoren für die Implantationszahl im Horn eine Wirkung auf das fetale und placentare Geburtsgewicht nachweisen. ECKSTEIN und McKEOWN (1955) konnten für das Meerschweinchen , BARR und Mitarbeiter (1969, 1970) für die Ratte zeigen, daß eine Erhöhung der Implantationszahl im Horn zu einer stärkeren Verminderung des Geburtsgewichtes führt als eine Erhöhung der Implantationszahl im Tier. ECKSTEIN und McKEOWN unterschieden daher zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen für diese Wachstumsbeeinträchtigung, wobei sie einen "lokalen" (Uterushorn) von einem "allgemeinen" (Wurfzahl) Effekt unterschieden.

Der Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung des fetalen und placentaren Wachstums in wurfstarken Tieren kann die Wirkung auf den Feten nicht ausschließlich klären, da das fetale Wachstum von weiteren Faktoren abhängig ist (FLEXNER 1939, McKEOWN 1953); so zeigt das fetale Gewicht am Termin auch eine Erhöhung bei unverändertem Placentagewicht, wenn die Implantationszahl erniedrigt ist.

1.2.4. Abhängigkeit der intrauterinen Entwicklung vom Implantationsort

In polytocen Tieren, die einen Uterus bicornis aufweisen, wird der Implantationsort zwischen Cervix und Ovar in Relation zu den benachbarten Implantationen (Nomenklatur siehe Methoden und Material) als "uterine Position" bezeichnet, während in uniporen Tieren der unterschiedliche Implantationsort angegeben wird. Je cervixnäher die Placenta gebildet wird, desto geringer ist das fetale Geburtsgewicht beim Menschen (LITTLE 1960, 1964).

McLAREN und MICHIE (1960) konnten an der superpregnanten Maus eine Erniedrigung des fetalen Geburtsgewichtes in der Mitte des Uterushornes zeigen; den leichtesten Feten fanden sie am häufigsten in der Nähe des Ovars. In spontan ovulierenden Mäusen fanden übereinstimmend McLAREN und MICHIE (1963), HASHIMA (1956) und HEALY und Mitarbeiter (1960) ein geringeres Gewicht bei den Feten, dessen Implantationsort dem Ovar am nächsten lag. Ausschließlich der ovarnächsten Position nehme zur Cervix hin das Geburtsgewicht ab, berichtete McLAREN (1965), wogegen HASHIMA (1956) ovar- wie auch cervixnah ein geringeres Geburtsgewicht fand.

TRASLER (1960) berichtete über ein gehäuftes Auftreten von Gaumenspalten in der ovarnächsten Position. BECK (1967) zeigte eine geringere Mortalität und höhere Mißbildungsrate in der ovarnahen Position. Welche ätiologische Beziehung zwischen uteriner Position, Wachstumsretardierung, Mißbildung und uteriner Blutversorgung besteht, ist nicht geklärt.

Auch unter der Einwirkung teratogener Substanzen fanden sich in Abhängigkeit vom Implantationsort unterschiedliche Häufigkeiten der embryotoxischen Effekte. Bei verschiedenen Mäusestämmen fand BECK (1967) nach Gabe von Trypanblau eine relativ höhere Sterblichkeit in den ovarnahen Positionen. Nach Vitamin-A-Gabe berichteten WOOLLAM und MILLEN (1961) dagegen über weniger Gaumenspalten in den ovarnahen Positionen. Nach Anoxie (Woollam und MILLEN 1962) überleben mehr Feten in den ovarnahen Positionen.

Schon die hier für die Maus referierten Ergebnisse zeigen Unterschiede. Zudem bestehen Speziesunterschiede in den das Wachstum begünstigenden Positionen. BARR und BRENT (1969, 1970) fanden bei der Ratte ein relativ höheres Geburtsgewicht in den mittleren Positionen. Das fetale Geburtsgewicht nimmt beim Kaninchen (ROSAHN 1936) mit der Entfernung vom Ovar zu. Beim Schwein (WALDORF und Mitarbeiter 1957) erwiesen sich die cervix- und ovarnahen Feten als schwerer.

Als Ursachen dieser positionsabhängigen unterschiedlichen Empfindlichkeiten auf schädliche Einflüsse wurden zwei Möglichkeiten diskutiert:

1) Unterschiede in der Blutversorgung, durch die positionsabhängig unterschiedliche Dosen teratogener Substanzen zum Feten gelangen (MOLL und KÜNZEL 1971, GIRARD 1970).

2) Altersunterschiede der Feten, welche unterschiedliche Empfindlichkeiten auf teratogene Substanzen bedingen würden (MOSSMAN 1937). Altersunterschiede sind gegeben durch den verschiedenen Zeitpunkt der Ovulation, der Befruchtung sowie der Implantation. Verschiedene Substanzen wirken selektiv nur in einer ganz bestimmten Entwicklungsphase teratogen (BRENT und JENSH 1967). Diese selektive embryotoxische Wirkung auf bestimmte Entwicklungsstadien könnte mit dafür verantwortlich sein, daß auch in Inzuchttieren nicht alle Feten eines Muttertieres gleichermaßen geschädigt sind.

1.3. EIGENE FRAGESTELLUNG

Um den ursächlichen Zusammenhang zwischen uteriner Position, Wachstumsretardierung und Mißbildung zu klären, sind embryotoxische Versuchsbedingungen geeignet, die im selben Muttertier unterschiedliche Wirkung auf die einzelnen uterinen Positionen entfalten. Bei Unterbindung der uterinen Gefäße zeigten WIGGLESWORTH (1964), BARR und BRENT (1970), daß die hervorgerufene Retardierung zur Cervix hin stärker wird. Die weitere

Untersuchung dieses Modells der intrauterinen Wachstumsretardierung scheint geeignet, die Abhängigkeit der einzelnen uterinen Positionen von der Blutversorgung im Laufe der Schwangerschaft zu untersuchen.

In teratologischen Untersuchungen muß man die Vergleichbarkeit von Feten verschiedener Würfe und Feten in einem Wurf voraussetzen können. Dies macht die Einführung gewisser Bedingungen bei der Versuchstierauswahl notwendig. Als äußere Einflüsse werden im allgemeinen definiert:

1) Alter des Muttertieres (KENNEDY und KENNEDY 1972, INGRAM und Mitarbeiter 1958)
2) Zahl der Trächtigkeiten (KENNEDY 1972, BRENT und JENSH 1967)
3) Aufzucht der Muttertiere (BRENT und JENSH 1967, KÖHLER 1970)
4) Paarungsbedingungen (BARR 1971, KÖHLER 1972)
5) Genetische Faktoren (FALCONER 1953, 1955; McCARTHY 1963)

Aufgabe dieser Arbeit ist es, durch Untersuchungen über die uterinen Einflüsse Bedingungen zu formulieren, nach denen die einzelnen Würfe ausgewählt werden können. Um diese Auswahl auch in der Phase der Organogenese zu gestatten, mußten die genannten uterinen Einflüsse in der Phase der Organogenese untersucht werden.

Um die Ursachen der Positionsabhängigkeit zu klären, wurde die fetale Wachstumskinetik in einem embryotoxischen Modell untersucht, welches sich positionsabhängig auswirkt.

2. METHODEN UND MATERIAL

2.1. TIERHALTUNG

Für die Versuche wurden Wistar Ratten des Stammes SW 69 verwendet, welche von der Firma Winkelmann (Kirchborchen) bezogen wurden. Bei unbeschränktem Leitungswasserangebot wurden die Tiere mit Altromin R ernährt. Bei 26° C und 60 % Luftfeuchtig-

keit wurden die Ratten unter einem definierten Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten (14 Std. hell bei 60 Lux: von 12.00 Uhr Mittag bis 2.00 Uhr nachts; 10 Std. dunkel: von 2.00 Uhr nachts bis 12.00 Uhr Mittag); neu gelieferte Tiere wurden wenigstens 14 Tage lang diesem Rhythmus angepaßt.

Zur Paarung wurden jeweils drei virginelle Weibchen mit einem Männchen von 7.00 bis 9.00 Uhr zusammengesetzt. Für den verwendeten Stamm liegt die Zeit des Kopulationsoptimums unter den genannten Bedingungen ca. 5 Std. nach Beginn der Dunkelperiode. Die Begrenzung der Paarungsdauer erlaubt eine auf 2 Std. genaue Bestimmung der Konzeption; bei freier Zeitwahl zur Paarung während der gesamten Dunkelperiode hingegen (BARR et al. 1970) kann es zu Altersunterschieden der Embryonen bis zu 10 Std. kommen - eine Zeitdifferenz, die zwischen Tag 11 und 12 einer Verdoppelung des embryonalen DNA-Gehalts gleichkäme (KÖHLER 1972). Weibliche Ratten lassen sich nur zyklusgerecht begatten. Durch Vaginalabstriche (ZONDEK 1935) läßt sich feststellen, ob ein Coitus stattgefunden hat, d.h. ob Spermien im Ausstrich sichtbar sind. Beim Nachweis von Spermien im Ausstrich ist damit zu rechnen, daß eine Befruchtung stattfinden wird. Die Schwangerschaftsrate betrug bei diesem Vorgehen in unseren Versuchen 80 bis 90 %.

Die 24 Stunden-Periode zwischen Auffinden der Spermien und 9.00 Uhr des folgenden Tages wurde als "Tag 0" bezeichnet.

2.2. OPERATION

Eine Gruppe von 68 Tieren - 180 bis 220 g schwer - wurde am Tag 11 unter Pentobarbital-Anästhesie (30 bis 45 mg/kg) operiert. Die Wärmestrahlung einer Lampe schützte die Ratten während der Narkose vor Auskühlung. Nach Rasur und Waschen mit 80 %igem Alkohol wurde das Abdomen durch einen 3 bis 4 cm langen Mittellinienschnitt eröffnet. Beide Uterushörner wurden betrachtet: für die Operation wurden nur Tiere ausgewählt, die keine erkennbaren Resorptionen in einem Horn enthielten und deren cervixnächste Implantation mindestens 0,5 cm entfernt

lag von der Cervix. Nahe der Cervix wurden die uterinen Gefäße des jeweils implantationsreicheren Horns doppelt unterbunden, das korrespondierende Horn diente als Kontrolle. Nach der Ligation wird das ligierte Horn allein von den ovariellen Gefäßen versorgt (vgl. Abb. 1 und 2).

Die vollständige Unterbrechung der Blutzufuhr über die Arteria uterina wurde an 10 Tieren überprüft:

1) Nach zusätzlichem Abklemmen der ovariellen Gefäße wurde Evans Blue intravenös verabreicht. Das ligierte Horn verfärbte sich makroskopisch nur, wenn die cervixnächste Implantation der Cervix näher als 0,3 cm lag. Im Regelfall kam es erst nach Lösen der Klemme über die ovariellen Gefäße zur Blaufärbung des gesamten Horns.

2) Nach zusätzlichem Abbinden der ovariellen Gefäße wurde intravenös ^{14}C-Glukose verabreicht. Im Blut des unterbundenen Horns, in den Embryonen, der Placentaranlage und der Amnionflüssigkeit konnte nach 5 Std. keine Radioaktivität gemessen werden.

Die intra- und postoperative Sterblichkeit der Muttertiere betrug 15 %. Von diesen Tieren starben 90 % während der Narkose an Atmungsstörungen; die pathologische Bronchialsekretion führte während des Nachschlafs bei diesen Tieren zur Verlegung der Atemwege. Ähnliche Beobachtungen teilte auch BRENT 1969 mit. Die Unterbindung der Arteria und Vena uterina entspricht nach Untersuchungen von LICHTON (1963) einer selektiven Arterienunterbindung.

Nach der Ligation wurde das Abdomen in zwei Schichten verschlossen. Bei Scheinoperationen wurde das Abdomen nach nachgeahmten Manipulationen an den Uterushörnern wieder verschlossen.

2.3. RADIOAKTIVE MARKIERUNG DES MÜTTERLICHEN SERUMS IN-VIVO

An den jeweils angegebenen Tagen (Tag 12, 13, 16) erhielten die Tiere eine intravenöse Injektion von 1 mCi/kg ^{14}C-Glukose

(spezifische Aktivität 360 mCi/mol). Die Injektion erfolgte in eine Schwanzvene, die nach Eintauchen des Schwanzes in Wasser von ungefähr 50° C gut sichtbar ist. Die ^{14}C-Glukose wurde in 0,9 %ig NaCl-Lösung (pH 7,4) verdünnt. 5 ml/kg Ratte wurden injiziert, eine Menge, die eine paravenöse Applikation sofort erkennen läßt.

Die Erhöhung der Glukose-Konzentration im Serum bleibt bei den verabreichten Mengen im physiologischen Bereich: Legt man eine Glukose-Konzentration im Blut von etwa 80 mg % zugrunde und berücksichtigt, daß eine 200 g schwere Ratte etwa 10 ml Blut enthält, so beträgt die Gesamtmenge an Glukose im Blut der Ratte etwa 8 mg. Bei einer Gabe von 1 mCi/kg und einer spezifischen Aktivität von 360 µCi/mol und einem Molekulargewicht von 180 erhält also eine Ratte 100 µg Glukose im Serum, wodurch sich die Glukose-Konzentration im Blut auf 81 mg % unerheblich erhöht. Verteilung und Kinetik der Glukose sind von KROWKE et al. (1971) diskutiert.

Dieser in-vivo Markierung wurden zwei verschiedene Gruppen von Tieren unterzogen:

1) eine Gruppe von 68 Tieren, deren uterine Gefäße am Tag 11 operativ unterbunden worden waren,

2) eine Gruppe von 21 unbehandelten Tieren.

2.4. BESTIMMUNG DER RADIOAKTIVITÄT IM MÜTTERLICHEN SERUM UND IN VERSCHIEDENEN EMBRYONALEN UND PLACENTAREN ZELLKOMPONENTEN

2.4.1. Präparation der Gewebe

5 Std. nach der intravenösen Gabe von ^{14}C-Glukose wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, das mütterliche Blut wurde aufgefangen. Der Uterus wurde so rasch wie möglich herauspräpariert. Zahl und intrauterine Lage von Resorptionen wurden bestimmt. Die Embryonalanlagen wurden herausgetrennt, Embryo und Placenta bzw. Placentaranlage wurden voneinander getrennt, einzeln gewogen und anschließend in 0,9 %iger NaCl + 1 %iger

Tabelle 2

Radioaktivität im mütterlichen Serum

Muttertier	Säurelösl. dpm/0,1 ml	Säureunlösl. dpm/0,1 ml
1	7010	24200
2	6750	24930
3	7160	21150
4	7880	26470
5	7470	22720
6	7410	23430
7	6930	29030
8	6000	20510
9	5620	26530
10	7300	24000
n = 10	M = 6953 SD = 685 = 10 %	M = 24297 SD = 2584 = 11 %

Am Tag 11 wurde die Arteria uterina ligiert. 5 Std. vor der Dekapitation am Tag 13 erhielten die Muttertiere 1 mCi Glukose intravenös. Die Radioaktivität im fraktionierten (vgl. 2.4.2.) mütterlichen Serum ist angegeben.

Glukose-Lösung gewaschen, um sie von möglicherweise anhaftender Amnion-Flüssigkeit zu befreien. Alle Präparationen wurden ausgeführt bei 0° bis 4° C in einem Kühlraum.

2.4.2. Bestimmung der Radioaktivität im mütterlichen Serum

Das Serum des bei der Dekapitation gewonnenen mütterlichen Blutes wurde durch Säurefällung getrennt in Säurelöslichen und Säureunlöslichen Anteil. Das Säureunlösliche wurde in 10 % NaOH gelöst. Die Radioaktivität der säurelöslichen und säureunlöslichen Fraktion sowie die Radioaktivität im unfraktionierten Blutserum wurde gemessen (Tab. 2), um die Vollständigkeit der intravenösen Applikation routinemäßig zu überprüfen und eine normale Kinetik des Glukose-Stoffwechsels im mütterlichen Organismus zu belegen - zwei Voraussetzungen dafür, daß Embryo und Placenta ein vergleichbares Angebot an radioaktiver Glukose erhalten (vgl. KROWKE et al. 1971).

2.4.3. Fraktionierung der einzelnen Embryonen und Placenten in verschiedene Zellkomponenten

Die Aufnahme der radioaktiven Vorstufen aus dem mütterlichen Blut in die wichtigstens embryonalen und placentaren Zellkomponenten wurde untersucht. Hierzu wurde eine von KROWKE (1970, 1971a, 1971b) et al. in Anlehnung an OGUR und ROSEN (1949) sowie SCHMIDT und TANNHAUSER (1945) beschriebene Fraktionierungsmethode verwendet, die für einen Teil der Versuche vereinfacht wurde. Jeder einzelne Embryo bzw. jede einzelne Placenta wurde einer Fraktionierung unterzogen.

2.4.3.1. Fraktionierte Säure-Laugen-Extraktion, modifiziert nach KROWKE

Die Embryonen der Muttertiere, die keiner Operation unterzogen worden waren, wurden folgendermaßen in ihre Zellkomponenten aufgetrennt:

Die Embryonen wurden homogenisiert in eiskalter 0,2 M Perchlorsäure + 1 %iger Glukose. Nach Zentrifugation wurde das Sediment

	Positionen									
	rechtes Horn						linkes Horn			
	O_1	O_2	m	m	c_2	c_1	c_1	m	m	O_1
Säurelösliche Fraktion dpm/ µg DNA	-	73	72	77	78	70	69	71	67	69
		M_{re} = 74,0 ± 3,4					M_{li} = 69,0 ± 1,6			
		99 %	97 %	104 %	105 %	95 %	100 %	103 %	97 %	100 %
Lipide dpm/µg DNA	-	79	89	86	84	83	84	81	76	79
		M = 84,2 ± 3,7					M = 80,0 ± 3,4			
		94 %	106 %	102 %	100 %	99 %	105 %	101 %	95 %	99 %
RNA dpm/µg DNA	-	55	57	56	56	54	54	55	55	54
		M = 55,6 ± 3,6					M = 54,5 ± 0,6			
		99 %	103 %	101 %	101 %	97 %	99 %	101 %	101 %	99 %
DNA dpm/µg DNA	-	43	48	46	46	41	44	43	45	45
		M = 44,8 ± 2,9					M = 44,3 ± 1,0			
		96,1 %	107 %	103 %	103 %	92 %	98,4 %	97,7 %	102,5 %	101,4 %

Protein dpm/µg DNA	-	81	80	82	83	81	75	72	75	73
		M = 81,4 ± 1,1					M = 73,8 ± 1,5			
		100 %	98 %	101 %	102 %	100 %	102 %	98 %	102 %	99 %
Gesamtaktivität dpm/µg DNA	-	330	345	348	347	328	327	323	318	314
		M = 339,6 ± 9,8					M = 320,4 ± 5,7			
		97 %	102 %	102 %	102 %	97 %	102 %	101 %	99 %	98 %
µg DNA/Embryo	-	331	304	340	284	331	350	331	331	358
		M = 318,0 ± 23,5					M = 342,3 / 13,2			
		104 %	96 %	107 %	89 %	104 %	102 %	97 %	97 %	105 %

Tabelle 3

Fraktionierung von embryonalem Gewebe, modifiziert nach KROWKE

Der unter 2.4.3.1 angegebenen Fraktionierung wurden die Embryonen von 21 Muttertieren unterzogen. Hier sind die Werte der Embryonen eines Muttertieres gemäß ihren intrauterinen Positionen (Definition siehe 2.8) aufgeführt. Das rechte Horn enthält 6_1 das linke 4 implantierte Embryonen. Der Embryo in der Position 0_1 rechts war resorbiert. Für jeden Embryo ist die ^{14}C-Radioaktivität in der betreffenden Fraktion, bezogen auf DNA, angegeben, fürjedes Horn der Mittelwert. Zudem ist für jeden Embryo die ^{14}C-Radioaktivität als Prozent vom Mittelwert im Horn ausgerechnet.

dreimal in eiskalter 0,2 M Perchlorsäure + 1 %iger Glukose und dreimal in 0,2 M Perchlorsäure gewaschen. Die Summe der Überstände wurde die "säurelösliche Fraktion" genannt. Anschließend wurden die Lipide mit einer zweimaligen Alkohol-Äther (3 : 1) und anschließenden Äther-Waschung extrahiert. Das verbleibende Sediment wurde in 0,3 n NaOH eine Stunde bei 37° C hydrolysiert, nach Säurefällung mit Perchlorsäure wurde das unlösliche Material abzentrifugiert. Der Überstand repräsentiert die RNA-Fraktion, welche z.T. auch sulfatierte Glycosaminoglykane enthält. Danach wurde das Sediment einmal in kalter 0,2 N Perchlorsäure gewaschen, zentrifugiert und die DNA zweimal extrahiert mit 0,5 N Perchlorsäure bei 75° C für 15 Minuten. Das nunmehr verbleibende Sediment enthält die Proteine, welche in 10 %iger Natronlauge bei 50° C gelöst werden. Tab.3 zeigt exemplarisch die Meßwerte, die bei Aufarbeitung eines Muttertieres erhalten wurden. Insgesamt wurden die Feten von 21 Muttertieren mit der oben angeführten Methode aufgearbeitet.

Im Gegensatz zu der von KROWKE (1971a) ursprünglich angegebenen Methode wurde auf eine Hydrolyse mit RNase und α-Amylase verzichtet.

2.4.3.2. Verkürzte Säure-Laugen-Extraktion

Die Embryonen und Placenten der Muttertiere, deren uterine Gefäße am Tag 11 operativ unterbunden worden waren, wurden folgendermaßen in ihre Zellkomponenten aufgetrennt:
Embryo und Placenta wurden homogenisiert in eiskalter 0,2 M Perchlorsäure + 1 %iger Glukose. Nach Zentrifugation wurde das Sediment dreimal in eiskalter 0,2 M Perchlorsäure + 1 %iger Glukose und dreimal in 0,2 M Perchlorsäure gewaschen. Die Summe der Überstände wurde entsprechend dem oben genannten Verfahren die "säurelösliche Fraktion" genannt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren zweimal mit 2 ml 0,5 N Perchlorsäure bei 75° C für 15 Minuten extrahiert. Das verbleibende Sediment - hauptsächlich Proteine und Lipide enthaltend - wurde in 10 %iger Natronlauge bei 50° gelöst.

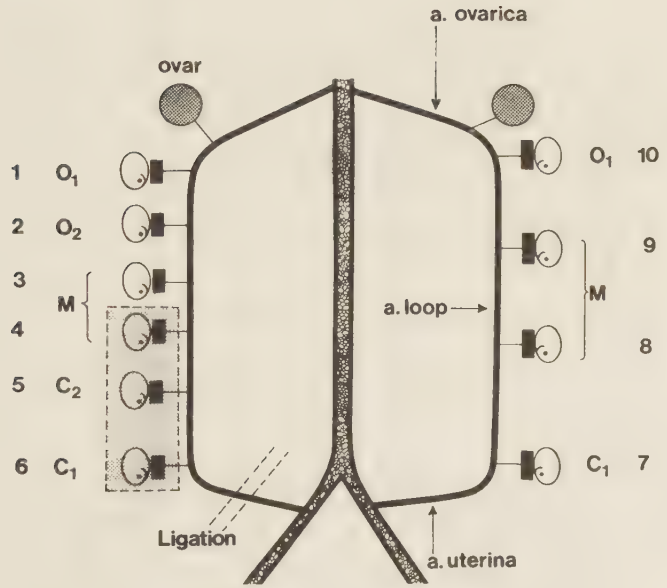

Abbildung 2

Uterus bicornis mit arterieller Blutversorgung nach Ligatur der Arteria uterina

Die Abbildung zeigt als Beispiel für Versuche nach Ligatur der Arteria uterina (68 Tiere) die uterine Lage der Feten (Definition der Positionen: O, M, C siehe 2.8.) in einem Muttertier, dessen Gefäße am Tag 11 der Schwangerschaft unterbunden wurden und welches am Tag 16 getötet wurde. Die Feten im „Kasten" sind resorbiert.

		ligated horn						control horn			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
wet weight per fetus	mg/fetus	440 97%	430 95 %	400 88 %				480	470	450	420
								M ± SD 450 ± 26 = 100 %			
DNA content per fetus	µg DNA/fetus	1990 95%	2120 101 %	2170 104 %				2204	2120	2030	1910
								M ± SD 2070 ± 130 = 100 %			
^{14}C-incorporation	dpm acid-soluble fraction /µgDNA/fetus	6,5 65%	8,2 82 %	8,3 83 %				9,1	9,7	10,5	10,6
								M ± SD 10,0 ± 0,7 = 100 %			
	dpm nucleic acids /µgDNA/fetus	8,1 101%	8,0 100 %	7,7 96 %				6,9	9,5	8,0	7,7
								M ± SD 8,0 ± 1,1 = 100 %			
	dpm proteins + lipids/µgDNA/ fetus	18,4 84 %	17,4 79 %	17,6 80 %				19,0	23,2	22,0	21,4
								M ± SD 21,9 ± 1,8 = 100 %			
	total acitivty /µgDNA/ fetus	33,0 84 %	33,6 85 %	33,6 85 %				35,0	42,4	40,5	39,8
								M ± SD 39,4 ± 3,1 = 100 %			

Tabelle 4

Beispiel eines Versuches nach Ligatur der art. uterina (Feten)

Die Tabelle gibt die Meßwerte des Muttertieres wieder, dessen uterine Verhältnisse Abbildung 2 zeigte. Die Meßwerte der einzelnen Feten wurden zudem jeweils als Prozent vom Mittelwert des Kontrollhornes ausgedrückt. Die Trennung in die einzelnen Zellkomponenten wurde mit der unter 2.4.3.2. beschriebenen verkürzten Fraktionierungsmethode durchgeführt. Der DNA-Gehalt wurde mit der von BURTON (2.5) angegebenen Methode bestimmt.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
wet weight per placenta mg/placenta		330 102 %	410 127 %	300 93 %				380 M ± SD 320 ± 45 = 100 %	270	320	320
DNA content perplacenta µg DNA/plac.		36 91 %	848 121 %	763 109 %				763 M ± SD 699 ± 100 = 100 %	551	720	763
^{14}C-incorporation	dpm acid soluble fraction / µgDNA/placenta	18,9 63 %	17,0 56 %	22,1 73 %				29,9 M ± SD 30,3 ± 15,2 = 100 %	30,3	35,5	46,1
	dpm nucleic acids/ µgDNA/ placenta	6,7 100 %	5,6 83 %	5,8 86 %				6,9 M ± SD 6,7 ± 1,6 = 100 %	5,0	7,1	7,7
	dpm proteins + lipids/ µgDNA/ placenta	25,4 117 %	25,8 120 %	21,3 98 %				25,6 M ± SD 21,6 ± 4,1 = 100 %	20,1	24,3	16,5
	total activity/ µgDNA/ placenta	51,0 77 %	45,3 68 %	49,2 74 %				62,3 M ± SD 66,5 ± 4,0 = 100 %	55,4	66,9	70,3

Tabelle 5

Beispiel eines Versuches nach Ligatur der art. uterina (Placenta)

Die Tabelle gibt die Meßwerte der Placenta wieder entsprechend den in Tabelle 4 aufgeführten Werten für die Feten.

Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde jeweils bezogen auf den DNA-Gehalt des entsprechenden Embryos oder der entsprechenden Placenta.

Abb. 2 zeigt die uterinen Verhältnisse eines Muttertieres, dessen Feten und Placenten am Tag 16 nach der hier angegebenen Methode aufgearbeitet wurden. Die sich hierbei ergebenden Werte sind in Tab. 4 und 5 als Beispiel aufgeführt.

2.4.3.3. Vergleich der beiden Fraktionierungsmethoden

Die Gesamtaktivität pro µg DNA, d.h. die Summe der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen, bezogen auf µg DNA, ist gleich groß. Durch das Weglassen der Lipidextraktion in der verkürzten Fraktionierungsmethode erhebt sich die Frage, in welcher Fraktion die Lipide wiedergefunden werden. Zur Klärung wurde folgendes Experiment durchgeführt. Wie unter "In-Vivo Markierung" geschildert, wurde schwangeren Ratten am Tag 11 intravenös 1 mCi/kg ^{14}C Palmitat verabreicht. Nach 3 Std. wurden die Tiere getötet und zum Vergleich beide Fraktionierungsmethoden durchgeführt. Wie aus Tab. 6 ersichtlich, findet sich das Palmitat nahezu vollständig in der letzten Fraktion wieder, die also in der verkürzten Fraktionierung die Proteine und Lipide enthält; die Verunreinigung der Nukleinsäure-Fraktion bei der verkürzten Fraktionierung durch die Lipide ist zu vernachlässigen.

Bei der von KROWKE angegebenen Säure-Laugen-Fraktion wird die RNA mit 0,3 N NaOH wie auch von SCHMIDT und TANNHAUSER (1945) vor der DNA-Extraktion hydrolysiert. Das Weglassen dieser vorgeschalteten RNA-Extraktion führt in der verkürzten Fraktionierung zu einem gemeinsamen Auffinden der RNA und DNA in einer Nukleinsäure-Fraktion.

Tab. 7 zeigt, daß die Summe der Aktivitäten der RNA- und DNA-Fraktion bei der nacheinander vollzogenen Extraktion der Aktivität in der gemeinsamen Nukleinsäure-Fraktion - gewonnen bei der verkürzten Fraktionierung - entsprechen (vgl. Abb. 3). Einerseits wurde die DNA-Bestimmung in der DNA-Fraktion, andererseits in

Tabelle 6

Vergleich der beiden Fraktionierungsmethoden

	Fraktionierung, modifiziert nach KROWKE	Verkürzte Fraktionierung
Gesamtaktivität	100 %	100 %
Säurelösliche Fraktion	1,8 %	1,8 %
Lipide	96 %	--
RNA	0,07 %	--
DNA	0,04 %	1,1 %
Proteine	2,2 %	98 %

5 Muttertieren wurde am Tag 11 + 0 h der Schwangerschaft 1 mCi ^{14}C-Palmitat (uniform markiert, 900 µCi/mMol) intravenös verabreicht. Drei Stunden später wurden die Tiere dekapitiert. Im Vergleich wurden die beiden Fraktionierungsmethoden (2.4.3.1. und 2.4.3.2.) durchgeführt. In der Tabelle ist die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen in Prozent von der Gesamtaktivität angegeben.

Tabelle 7

Vergleich der beiden Fraktionierungsmethoden

	Fraktionierung, modifiziert nach KROWKE	Verkürzte Fraktionierung
dpm Gesamtaktivität/µg DNA	270 ± 25	285 ± 30
dpm Säure/µg DNA	64 ± 8	71 ± 8
dpm Lipide/µg DNA	71 ± 8	
dpm RNA/µg DNA	45 ± 5	77 ± 8
dpm DNA/µg DNA	38 ± 4	
dpm Protein/µg DNA	62 ± 8	137 ± 14

Am Tag 13 der Schwangerschaft wurden mit ^{14}C-Glukose in-vivo markierte (siehe 2.3) Feten vergleichsweise zwei Fraktionierungsmethoden (2.4.3.1 und 2.4.3.2) unterzogen. Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fraktionen ist wiedergegeben.

der Nukleinsäure-Fraktion durchgeführt. Die bei fehlender RNA-Extraktion in der Nukleinsäure-Fraktion noch vorhandene Ribose stört bei der Diphenylamin-Reaktion nicht (BURTON 1956).

2.4.4. Reinheit der verschiedenen Fraktionen

Die Reinheit der erhaltenen Fraktionen wurde von KROWKE (1971) durch den Einbau spezifischer Vorstufen in die einzelnen Zellkomponenten geprüft. Es wurde ^{14}C Palmitat für die Lipid-Fraktion, ^{3}H-Uridin und ^{14}C-Orotsäure für die RNA-Fraktion, ^{3}H-Thymidin für die DNA-Fraktion und ^{3}H-Phenylalanin für die Proteine verwendet (Abb. 3). Zusätzlich wurden die sulfatierten Glycosaminoglycane durch die Gabe von ^{35}S markiert. Überträgt man die sich hierbei ergebenden Reinheiten der einzelnen Fraktionen auf die Markierungen mit ^{14}C-Glukose, so ergibt sich: in der RNA-Fraktion gehen 20 % der ^{14}C-Aktivität zu Lasten von sulfatierten Glycosaminoglycanen. Die DNA-Fraktion ist mit Glycogen verunreinigt, der Prozentsatz der Verunreinigung hängt ab vom Glycogengehalt des Gewebes. Der Glycogengehalt des embryonalen Gewebes steigt während der Schwangerschaft (DE PLAEN 1970), so daß auch die Verunreinigung der DNA-Fraktion an Glycogen zunimmt; zwischen Tag 11 und Tag 13 gehen etwa 16 - 20 % der in der DNA-Fraktion gefundenen Aktivität nach ^{14}C-Glukose-Gabe zu Lasten der Kohlehydrate. Die Protein-Fraktion bzw. die Protein-Lipid-Fraktion der verkürzten Fraktionierung ist frei von wesentlichen Verunreinigungen.

2.4.5. Messung der Radioaktivität

Für die Radioaktivitätsmessung wurde ein Flüssigkeits-Scintillations-Zähler der Firma Packard, Modell 3380, verwendet. Toluol diente als Lösungsmittel. Als "erster" Scintillator wurde 2,5 - Diphenyloxazol (PPO), als"zweiter" Scintillator wurde 1,4 - Di 2-(5-phenyloxazolyl) benzol (POPOP) verwendet. Die Zählflüssigkeit kann folgendermaßen hergestellt werden: 8 g PPO und 100 mg POPOP werden in 2 l Toluol gelöst; dieser Mischung wird 1 l Triton X 100 zugesetzt. Pro Zählgefäß werden 10 ml dieser Lösung eingesetzt

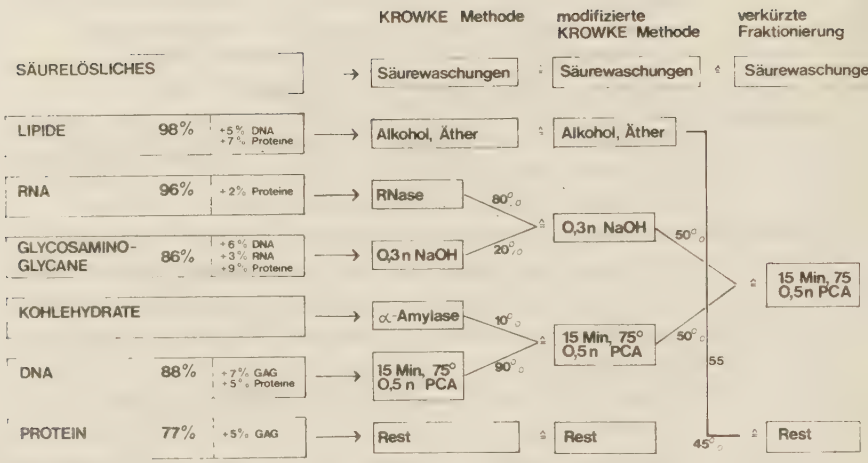

Abbildung 3

Vergleich von Fraktionierungsmethoden

Es wird die von KROWKE et al. (1971) angegebene Methode verglichen mit einer "modifizierten" (2.4.3.1.) und einer "verkürzten" (2.4.3.2.) Methode. Die Fraktionen, die mit der von KROWKE angegebenen Methode erhalten werden, sind auf der linken Seite angegeben. Das prozentuale Auffinden der Zellkomponenten in den nach ihrem Hauptbestandteil benannten Fraktionen sowie die Kontamination mit anderen Zellkomponenten wurde mit radioaktiv markierten Vorstufen von KROWKE et al. (1971) bestimmt (siehe 2.4.4.) und ist in der Tabelle angegeben. Das Auslassen einzelner Fraktionierungsschritte führt zum Auffinden dieser Fraktionen in den folgenden Fraktionen. Für die ^{14}C-Glukose-in-vivo-Markierung ist die prozentuale Zusammensetzung der Radioaktivität in den nachfolgenden Fraktionen angegeben. Die ^{14}C-Aktivität der 0,3 n NaOH-Fraktion beispielsweise geht in der modifizierten Aufarbeitung zu 80 % zu Lasten der RNA-Fraktion und zu 20 % zu Lasten der Glycosaminoglycane.

und 0,1 - 0,5 ml Probelösung hinzugefügt. Ist die zugegebene Probelösung nicht stark sauer, trübt sich die Lösung; durch Zugabe von Perchlorsäure muß das Gemisch wieder geklärt werden, wobei eine durch zu großen Säureüberschuß bedingte Grünverfärbung vermieden werden sollte, um Fluoreszenzlösch-Effekte ("Quenching") zu vermeiden. Die Radioaktivitätsmessung wird im Packard Tricarb, Modell 3380, gegen einen externen Standard durchgeführt, für den eine Radium- und Amiritheum-Strahlenquelle zur Erzeugung eines Compton-Spektrums dient, welches in der gleichen Weise Fluoreszenzlösch-Effekten wie das ß-Spektrum der Probe unterliegt.

Unter Berücksichtigung von Fluoreszenzlösch-Effekten und Zählausbeute wurden die ermittelten Impulse pro Minute umgerechnet auf Zerfälle pro Minute. Der Zählvorgang wurde jeweils so eingerichtet, daß die ermittelten Impulse pro Minute mit einem Fehler von höchstens 2 % angegeben werden können.

2.5. BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTS

Die DNA-Bestimmung wurde mit der von DIESCHE angegebenen Methode in der Modifikation von BURTON (1956) durchgeführt. Zur Eichung wurden Desoxyglukose und DNA verwendet. Die photometrischen Messungen wurden am DB-G Spectrophotometer der Firma Beckman durchgeführt.

2.6. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE TECHNIK

Am Tag 13 wurden Embryo und Placenta, wie oben beschrieben, präpariert. Unter dem Stereomikroskop wurde untersucht, ob der Embryo Herzpulsationen aufweist. Anschließend wurden Placenta und Embryo in toto in einer modifizierten Karnovski-Lösung fixiert, welche aus 3 % Glutaraldehyt, 3 % Paraformaldehyt in 0,2 molaren Cacodylat-Puffer (pH 7,2) besteht. In der Fixierungsflüssigkeit wurden Placenta und Embryonen in kleinere Teile zerlegt. Nach mehrmaligem Waschen in der Pufferlösung wurde in einer aufsteigenden Acetonreihe (50, 70, 90, 3 x 100 %) entwässert. Nachfixiert wurde mit 1 %iger OsO_4-Lösung. Das Material wurde

in Mikropal eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit LKB- und Reichert-Mikrotomen hergestellt. Die Kontrastierung erfolgte mit Uranyl-Acetat und Bleicitrat. Die Aufnahmen wurden hergestellt mit Siemens-Elmiskopen I und Ia bei einer Strahlspannung von 80 kv, Blenden 50 bis 200 µ und einer Primärvergrößerung von 1000 - 40.000. Zur Beurteilung dienten 3 1/2 fache positive Papierabzüge. Zur Orientierung im Schnitt wurden sog. Semidickschnitte hergestellt, mit alkoholischer Giemser Lösung für 1 Minute bei 60° C gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Prof. J. MERKER angefertigt.

2.7. TERATOLOGISCHE TECHNIK

Am Tag 20 wurden die Ratten nach Dekapitation durch Kaiserschnitt entbunden. Zahl und Lage der Resorptionen wurden festgestellt, bei deutlich erkennbarer Placenta wurden die Resorptionen als späte Resorptionen eingestuft, andererseits als frühe Resorptionen. Die lebenden Feten und die Placenta wurden nach sorgfältiger, Blutverluste vermeidender Trennung auf 10 mg genau gewogen. Daraufhin wurden sie in 4 %iger Formalinlösung fixiert. Anschließend 12 Stunden gewässert. Mittels eines Bauchschnittes wurden die Feten exenteriert. Die exenterierten Feten wurden eine Woche lang in Äther-Alkohol-Lösung (1 : 3) entwässert und ihre Fettbestandteile gelöst. Hierauf folgte eine eintägige Wässerung. Anschließend wurden die Feten eine Woche lang in 10 %iger KOH aufgehellt und die Skelette mit Alizarin ($0{,}6 \times 10^{-3}$ %) angefärbt (DAWSON 1926). Es folgte eine eintägige Wässerung, woraufhin die Feten in eine Benzylalkohol-Glycerin-Alkohol(1 : 2 : 2)-Lösung gelegt wurden. Schließlich aufbewahrt wurden die Feten in einer Glycerinlösung. Unter dem Stereomikroskop erfolgte die Untersuchung auf Skelettmißbildungen in Anlehnung an LORKE (1963, 1964), wobei insbesondere Schädel-, Extremitäten-, Wirbelkörper-, Rippen-, Brustbein- und Hüftknochenmißbildungen berücksichtigt wurden.

2.8. NOMENKLATUR DER INTRAUTERINEN POSITIONEN

Die Position der Embryonen, welche nächst der Cervix liegen, wurde C_1, die Position der Embryonen, welche nächst dem Ovar liegen, wurde O_1 genannt; die jeweils vorletzten Positionen wurden C_2 und O_2 genannt. In Hörnern mit einer ungeraden Anzahl von Implantationen wurde jeweils die mittlere Position: M genannt, in Hörnern mit einer geraden Zahl von Embryonen wurde jeweils der Wert für die Position M errechnet als Mittelwert aus den beiden mittleren Positionen.

2.9. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Ergebnisse wurden nach ihrer statistischen Signifikanz jeweils mittels des x^2-Tests und des Student-Test geprüft. Die P-Werte für den errechneten X^2 wurden aus den Tabellen von HALD und SINKBAEK (1950) entnommen. Der t-Wert des Student-Tests wurde nach den von PÄTAU (1943) angegebenen Verfahren ermittelt, und der p-Wert in den entsprechenden Tabellen nachgeschlagen. Die Rechnungen wurden durchgeführt mit einem Wang Computing System 370, wobei die einzelnen Rechenvorgänge auf Lochkarten programmiert wurden.

3. BEEINFLUSSUNG DES WACHSTUMS UND DER ENTWICKLUNG VON RATTEN-EMBRYONEN NACH OPERATIVER UNTERBINDUNG DER UTERINEN GEFÄSSE

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. WIRKUNG VON PENTOBARBITAL AUF DAS FETALE WACHSTUM

Um den Effekt der operativen Unterbindung der uterinen Gefäße auf diese selbst zurückführen zu können, müssen die mit einer Operation verbundenen Faktoren als Ursache für diese Effekte ausgeschaltet werden. Zum Vergleich zu Embryonen aus unbehandelten Muttertieren wurden hierzu die Embryonen der operierten Muttertiere verwendet, die im sog. Kontrollhorn lagen, d.h. deren Gefäße unangetastet blieben bei der Operation. Der mittlere DNA-Gehalt der Embryonen des Kontrollhorns wurde ver-

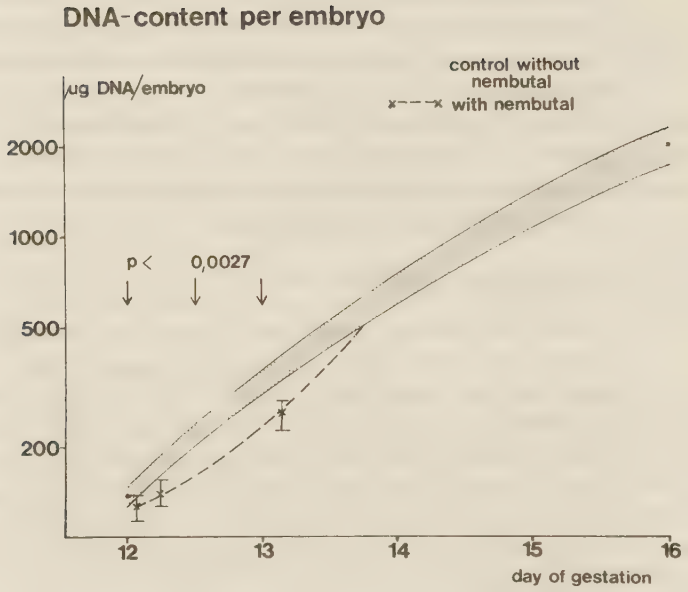

Abbildung 4

Auswirkung der Pentobarbital-Anaesthesie auf den embryonalen DNA-Zuwachs in der Schwangerschaft

Im halblogarithmischen Diagramm ist der embryonale DNA-Zuwachs im Verlauf der Schwangerschaft angegeben. Der DNA-Gehalt wurde mit der von BURTON (1956) angegebenen Methode bestimmt. Jeder Mittelwert ist das Ergebnis von wenigstens 10 Meßwerten. Eine Gruppe von Tieren wurde am Tag 11 mit Pentobarbital (Nembutal^{R} 35 mg/kg) anaesthesiert. Die mit Pentobarbital behandelten Tiere zeigen am Tag 12 und 13 einen signifikant geringeren, am Tag 14, 15, 16 einen im Normbereich liegenden DNA-Gehalt.

glichen mit dem mittleren DNA-Gehalt von Embryonen, die aus unbehandelten Muttertieren stammen. Der DNA-Gehalt ist ein genaues und empfindliches Kriterium für das Wachstum, zumal er sich von Tag 11 zu Tag 12 versiebenfacht und vom Tag 12 zu Tag 13 um den Faktor 2,5 zunimmt (KÖHLER, 1970, 1972). Abb. 4 zeigt, daß die Embryonen aus Pentobarbital(FURNER et al. 1972) behandelten Muttertieren am Tag 12 und 13 einen verminderten DNA-Gehalt aufweisen. Am Tag 14 ist kein Unterschied im DNA-Gehalt mehr feststellbar gegenüber unbehandelten Tieren (Tab. 4).

Diese zeitlich begrenzte Verminderung des DNA-Gehalts der Embryonen aus den anästhesierten Tieren weist darauf hin, daß es unter der Pentobarbital-Anästhesie zu einer zeitlich begrenzten Verzögerung des Wachstums kommt und dieses verzögerte Wachstum zu einem späteren Zeitpunkt nachgeholt werden kann. Ob das verzögerte Wachstum auch von einer verzögerten Differenzierung begleitet wurde, wurde nicht untersucht. Aus den Befunden ist zu schließen, daß zumindest eine durch Pentobarbital verursachte Wachstumsverzögerung nachgeholt werden kann.

Die vorübergehende Verminderung von embryonalen Syntheseleistungen wurde auch nach Gabe von Chlorampenicol mitgeteilt (OERTER und BASS 1971). Die Veränderungen der fetalen Wachstumskinetik unter embryotoxischen Einflüssen bleibt bei teratologischen Untersuchungen des Feten am Geburtstermin unentdeckt. Während des Zeitraums, in dem die Embryonen eine Wachstumsverzögerung aufweisen, zeigt der DNA-Gehalt der dazugehörigen Placenten keinen Unterschied zwischen Pentobarbital-behandelten und unbehandelten Tieren.

3.2. AUSMASS UND REIHENFOLGE DER FETALEN LETALITÄT NACH UNTERBINDUNG DER UTERINEN GEFÄSSE

Tiere, deren uterine Gefäße am Tag 11 nahe der Cervix unterbunden wurden, wiesen bis zum Tag 16 eine ansteigende Zahl von Resorptionen auf (Abb. 5). Sowohl die Zahl der von Resorptionen

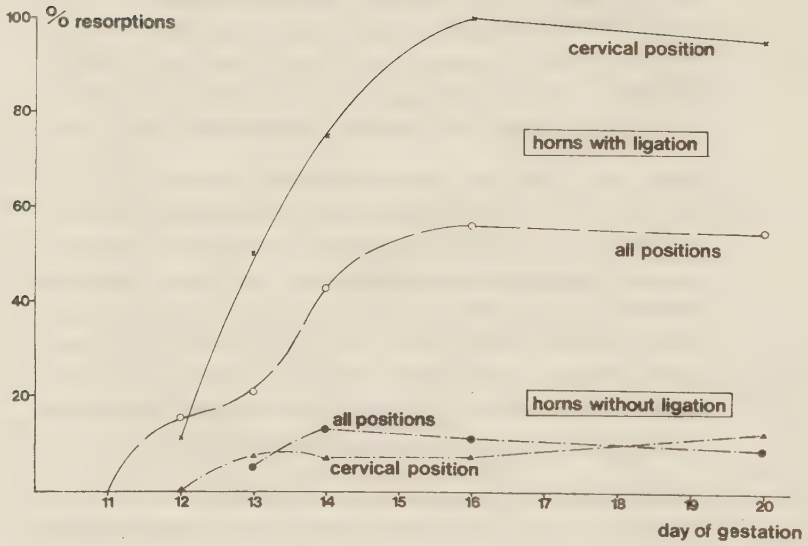

Abbildung 5

Embryolethalität nach Unterbindung der uterinen Gefäße

Cervical position = cervixnächste Position in einem Muttertier.
Die Unterbindung der uterinen Gefäße (2.2) wurde am Tag 11 der Schwangerschaft durchgeführt. Die Position der Resorptionen ist in Abb. 7 für jedes Muttertier angegeben.

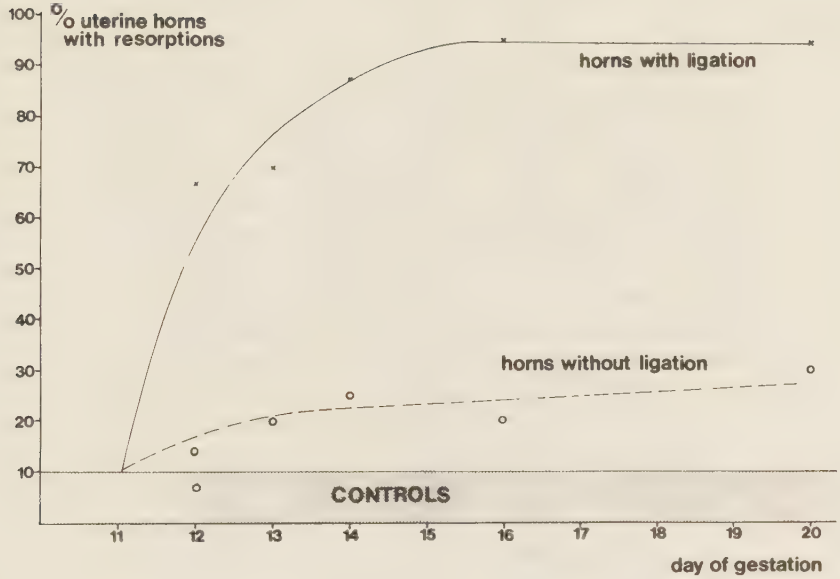

Abbildung 6

Muttertiere mit Resorptionen nach Unterbindung der uterinen Gefäße

Es ist der Prozentsatz der Uterushörner angegeben, in denen nach Unterbindung der uterinen Gefäße Resorptionen auftraten. Die einzelnen Uterushörner sind in Abb. 7 aufgeführt.

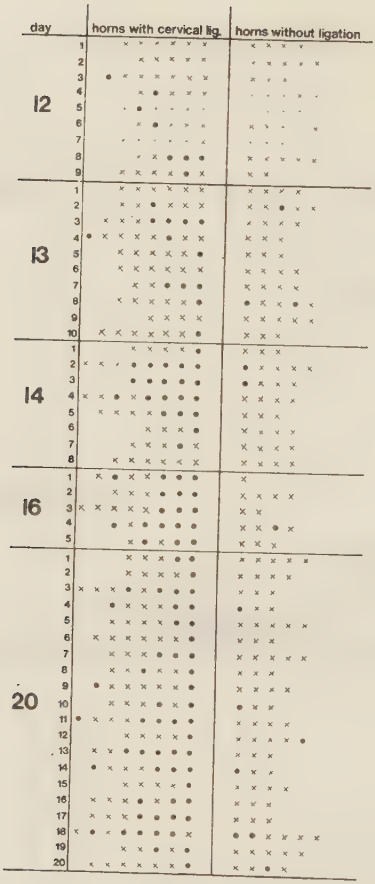

Abbildung 7

Uterine Position von Resorptionen nach Unterbindung der uterinen Gefäße

× lebender Embryo bzw. Fet

● Resorption

In dem Schema liegen die links und rechts angezeigten Implantationen jeweils ovarnah und die mittleren cervixnah.

betroffenen Hörner nimmt zu (Abb. 6) wie auch die Anzahl von Resorptionen in den jeweiligen Hörnern. Fünf Tage nach der Ligation weisen alle Hörner der operierten Seite Resorptionen auf, währenddessen nur in 10 % der Kontrollhörner Resorptionen aufgetreten sind.

Zusätzlichen Aufschluß erhält man, wenn man die Reihenfolge des fetalen Todes in Beziehung setzt zu den unterschiedlichen uterinen Positionen (Abb. 7). Am Tag 12 - 24 Std. nach der Ligation - ist keine der intrauterinen Positionen bevorzugt von Resorptionen betroffen. Die Zahl der Resorptionen hat an diesem Tag gegenüber dem Kontrollhorn nur um 5 % zugenommen. Am Tag 13 aber - 48 Std. nach der Operation - sind die Embryonen in den Positionen, die nahe der Ligation liegen, doppelt so häufig abgestorben wie in allen übrigen Positionen zusammen. Noch ausgeprägter ist dieser Effekt am Tag 13 - 72 Std. nach der Operation: nunmehr sind 70 % der Feten in Position C_1 resorbiert gegenüber 10 % in Position O_1. Am Tag 16 - 120 Std. nach der Operation - oder zu späterem Zeitpunkt weist die Position C_1 90 - 100 % Resorptionen auf, die Position C_2 50 %. Auch in den Positionen M ist das letale Risiko mit 50 % noch signifikant höher als das Risiko in den Positionen O.

3.3. AUSWIRKUNG DER LIGATUR AUF GEWICHT UND DNA-GEHALT VON FET UND PLACENTA

Um die biologische Streuung zwischen verschiedenen Würfen (vgl. hierzu "Littereffekt" JENSH et al. 1970), das unterschiedliche Angebot an ^{14}C-Glukose aus dem mütterlichen Serum ($\pm$ 10 %) (Vgl. Tab. 2) und die vom Gestationstag abhängigen unterschiedlichen Einbauraten in die einzelnen Fraktionen (Abb. 8, 9, 10 und Tab. 8) auszuschließen, wurden die Einzelwerte der nach Positionen geordneten Embryonen und Placenten jeweils als Prozent vom Mittelwert des Kontrollhorns ausgedrückt. Wie Abb. 7 zeigt, wurde die Ligatur jeweils im implantationsreicheren Horn durchgeführt. Diese Selektion ist - wie

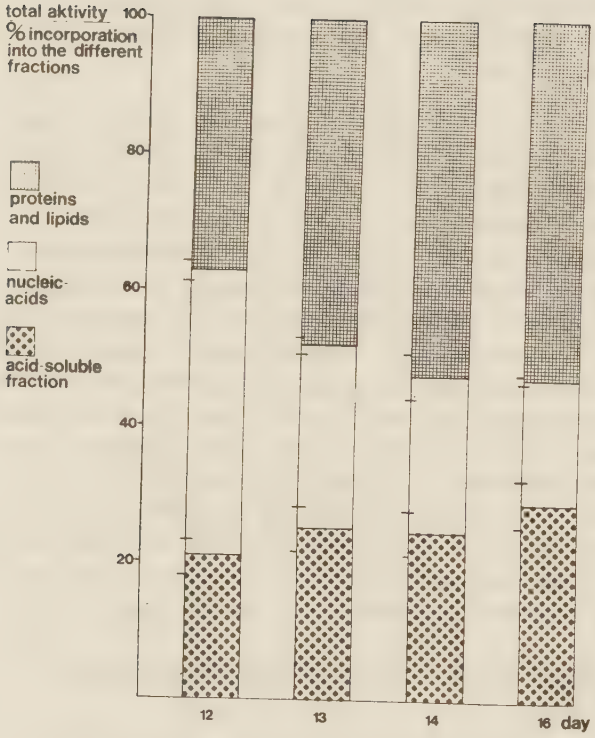

Abbildung 8

Verteilung der Radioaktivität auf embryonale Zellkomponenten

5 Std. vor der Fraktionierung der Embryonen (vgl. 2.4.3.2.) erhielten die Muttertiere intravenös ^{14}C-u-Glukose (vgl. 2.3.). Der ^{14}C-Einbau in die einzelnen Fraktionen ist jeweils in Prozent von der mittleren Gesamtaktivität im Embryo angegeben. Die Unterschiede in der Verteilung der ^{14}C-Radioaktivität auf die einzelnen Zellkomponenten im Verlaufe der Schwangerschaft sind signifikant ($P < 0{,}0027$).

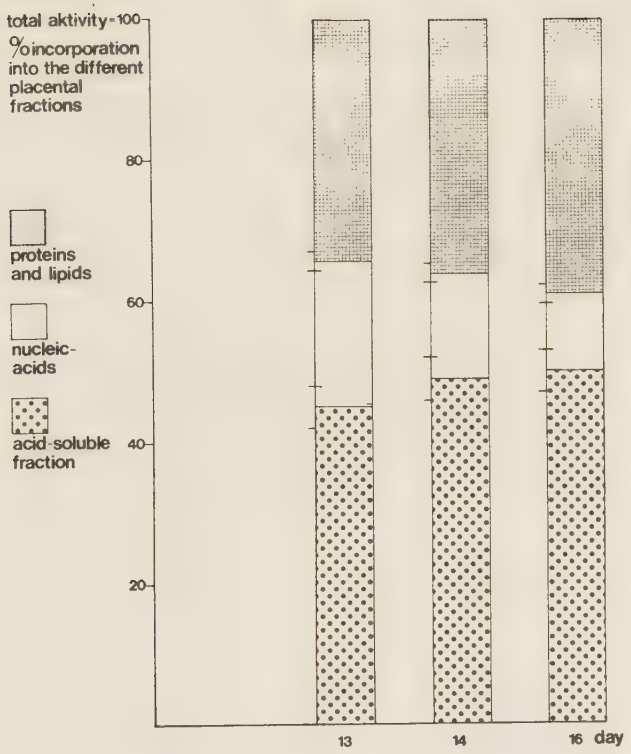

Abbildung 9

Verteilung der Radioaktivität auf placentare Zellkomponenten

5 Std. vor der Fraktionierung der Placenten (vgl. 2.4.3.2.) erhielten die Muttertiere intravenös ^{14}C-u-Glukose (vgl. 2.3.). Der ^{14}C-Einbau in die einzelnen Fraktionen ist jeweils in Prozent von der mittleren Gesamtaktivität im Embryo angegeben. Die Unterschiede der Verteilung der ^{14}C-Radioaktivität auf die einzelnen Zellkomponenten im Verlaufe der Schwangerschaft sind signifikant ($P < 0{,}0027$).

Einbau von ^{14}C-Glukose in embryonale und placentare Zellkomponenten, DNA-Gehalt, Feuchtgewicht

		dpm / µg DNA +)				µg DNA/ Embryo, Fet oder Placenta	mg Feuchtgewicht/ Embryo, Fet oder Placenta	n
		Säurelösliche Fraktion	NS	Lipide, Proteine	Gesamtaktivität			
Embryo	Tag 11	120 ± 42	256 ± 26	169 ± 15	545 ± 55	10 ± 2	2,6 ± 0,3	4
	12	100 ± 40	122 ± 9	137 ± 10	359 ± 34	57 ± 16	17 ± 4	37
	13	71 ± 8	77 ± 8	137 ± 14	285 ± 30	260 ± 27	43 ± 5	37
	14	53 ± 7	49 ± 7	112 ± 18	214 ± 25	739 ± 94	129 ± 12	4
	16	30 ± 4	25 ± 2	60 ± 8	115 ± 10	2016 ± 295	425 ± 50	26
Placenta	Tag 13	157 ± 20	73 ± 7	120 ± 13	350 ± 40	233 ± 30	119 ± 18	37
	14	159 ± 38	49 ± 8	113 ± 18	321 ± 56	529 ± 88	222 ± 16	4
	16	48 ± 3	11 ± 1	39 ± 5	98 ± 9	754 ± 133	268 ± 5,3	26

Die n = Zahl der untersuchten Embryonen bzw. Placenten.

+) Werte entsprechen Abb. 10.

Tabelle 8

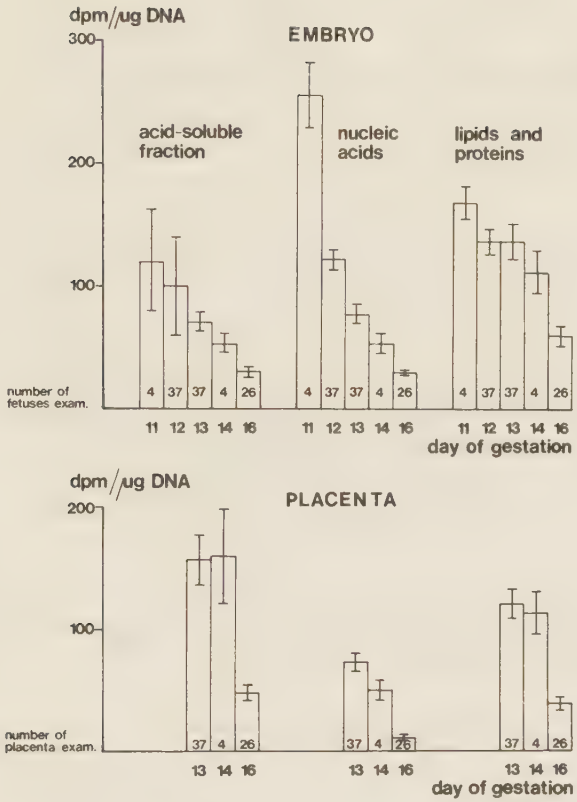

Abbildung 10

Einbau von ^{14}C-Glukose in embryonale und placentare Zellkomponenten

5 Std. vor der Fraktionierung von Embryo und Placenta (vgl. 2.4.3.2.) erhielten die Muttertiere intravenös ^{14}C-Glukose (vgl. 2.3.). Die Meßwerte sind auf den embryonalen bzw. placentaren DNA-Gehalt bezogen. Die Werte für Tag 11 der Schwangerschaft sind uns freundlicherweise von Dr. Ralph KROWKE überlassen worden und wurden auf die angegebene Fraktionierungsmethode (vgl. Tab. 7) umgerechnet.

unter 5.1. und 5.2. ausgeführt werden wird - für die embryonale Entwicklung während der Organogenese bedeutungslos.

3.3.1. Auswirkung der Ligation auf den fetalen DNA-Gehalt

Am Tag 12 - 24 Std. nach der Ligation - ist der DNA-Gehalt in keiner der Positionen des operierten Horns gegenüber dem Kontrollhorn erniedrigt. Am Tag 13-48 Std. nach der Unterbindung - zeigen die lebenden Feten in der uterinen Position C_1 gegenüber den Feten in den Positionen C_2, M oder O hochsignifikante ($p < 0{,}0027$) Verminderungen im DNA-Gehalt pro Embryo (Abb.11). Während die Embryonen im Kontrollhorn in der 24-Stunden-Periode von Tag 12 zu Tag 13 im Mittel einen Anstieg im DNA-Gehalt von 203 µg aufweisen, synthetisiert der Embryo in der Position C des ligierten Horns nur 120 µg DNA in derselben Zeit. Dies bedeutet eine Verminderung in der DNA-Synthese um 40 %. Alle Feten in dieser Position und ein Großteil der Feten in der benachbarten Position C_2 werden 48 Std. später, d.h. am Tag 16, als Resorption aufgefunden.

In den verbleibenden uterinen Positionen - M und O - kann am Tag 16 keine signifikante Verminderung des DNA-Gehalts beobachtet werden (Abb.11).

3.3.2. Auswirkung der Ligation auf das fetale Gewicht

Nach Tag 16 sind die Feten schwierig zu homogenisieren; daher ist die Messung des DNA-Gehalts erschwert. Daher wurde für Feten von Tag 16 bis zum Geburtstermin das Feuchtgewicht als Parameter für eine Wachstumsretardierung herangezogen. Zudem haben die meisten der früheren Untersucher das Feuchtgewicht als Beweis für eine Wachstumsretardierung angeführt und es besteht somit eine bessere Vergleichsmöglichkeit.

Die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß am Tag 16 die Feten in den uterinen Positionen M ein signifikant vermindertes Feuchtgewicht aufweisen. Der embryonale DNA-Gehalt

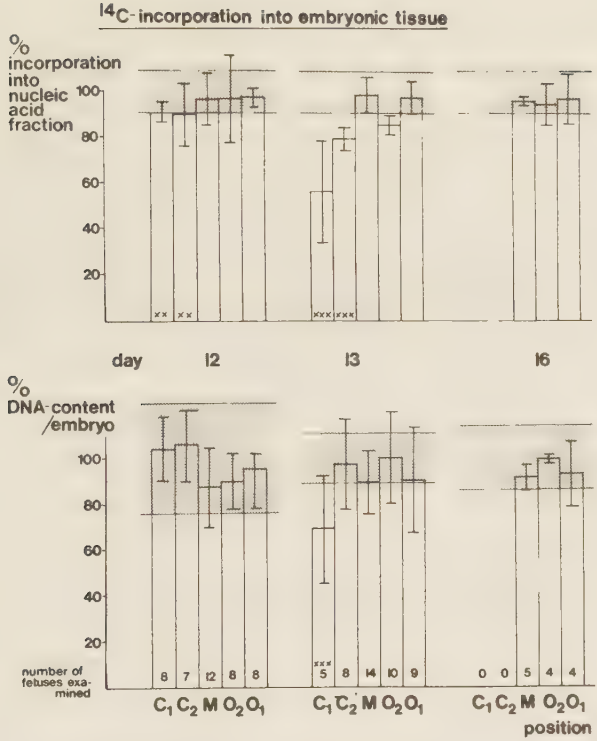

Abbildung 11

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße eines Hornes operativ (vgl.2.2.) unterbunden. 5 Std. vor der Schnittentbindung erhielten die Muttertiere 1 mCi ^{14}C-Glukose intravenös. Die Embryonen wurden fraktioniert (2.4.3.2.) in einzelne Zellkomponenten. Die Meßwerte (Radioaktivität bezogen auf DNA-Gehalt in der Nukleinsäure-Fraktion, DNA-Gehalt) sind angegeben als Prozent vom Mittelwert des jeweiligen Kontrollhornes. Definition der Positionen (C_1, C_2) siehe 2.8.

xxx $P < 0{,}0027$, xx $P < 0{,}01$, x $< 0{,}05$ Signifikanz gegenüber Feten im Kontrollhorn

$\tilde{M} \pm SD$ der Feten im Kontrollhorn

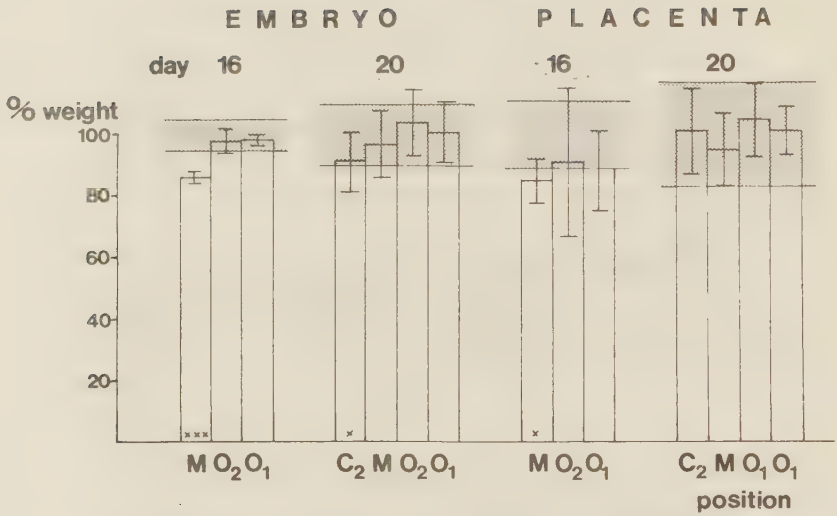

Abbildung 12

Feuchtgewicht von Embryo und Placenta

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße eines Horns operativ unterbunden. Die Werte sind in Prozent vom jeweils korrespondierenden, nicht-ligierten Horn angegeben.

xxx $P < 0{,}0027$, xx $P < 0{,}01$, x $P < 0{,}05$

Definition der Positionen vgl. 2.8.

sowie der ^{14}C-Einbau in die Nukleinsäuren dagegen war im unteren Bereich der Normalwerte gefunden worden. Die Verminderung des Feuchtgewichts ist also nicht Ausdruck einer verlangsamten Zellteilung. Auch eine Abnahme des fetalen Wassergehaltes dürfte für die Feuchtgewichtsverminderung nicht verantwortlich sein, da WIGGLESWORTH (1964), HOHENAUER und OH (1969) sowie ROUX (1971) übereinstimmend eine Erhöhung des Wassergehaltes der nach Ligatur der Arteria uterina retardierten Feten fanden. Ein intrazelluläres Ödem und damit eine Erhöhung des Wassergehaltes ist eine häufige Folge embryotoxischer Einwirkungen (vgl. GRABOWSKI 1964). Parallel zur Feuchtgewichtsverminderung sehen wir eine verminderte fetale "Gesamtaktivität", die durch einen verminderten ^{14}C-Einbau in die Protein-Lipid-Fraktion bedingt ist. Entsprechend berichteten HOHENAUER und OH (1969) über einen verminderten Gehalt an Lipiden (28 %) und Proteinen (18 %) bei durch Ligatur der Arteria uterina retardierten Feten am Tag 20.
Bermerkenswert hierbei ist die Tatsache, daß die Zellteilung unangefochten weiterläuft trotz gestörter Protein- und Lipidsynthese und intrazellulären Ödem.
In unseren Experimenten konnte keine signifikante Retardierung für die Feten in den Positionen O_1 und O_2 gezeigt werden.

3.3.3. Wachstum der Placenta nach Unterbindung der uterinen Gefäße

Die placentare Feuchtgewichtszunahme der Kontrollen ist in Abb. 13 aufgezeigt. In Abb. 11 sind ferner die Mittelwerte aus dem Feuchtgewicht der Placenten, die im experimentellen Horn angelegt wurden, aufgetragen. Im Vergleich zum placentaren Feuchtgewicht der Kontrollen wird im ligierten Horn 72 bis 96 Std. nach der Ligation der uterinen Gefäße eine signifikante ($P < 0{,}0027$) Verminderung des Feuchtgewichtes gefunden; ab Tag 16 liegen die Placentagewichte aus den ligierten Hörnern im Bereich der Werte der Kontrollhörner.

3.4. AUFNAHME VON ^{14}C-GLUKOSE IN EMBRYONALE UND PLACENTARE ZELLKOMPONENTEN

Weiteren Einblick in die Auswirkung uteriner Gefäßligation wurde

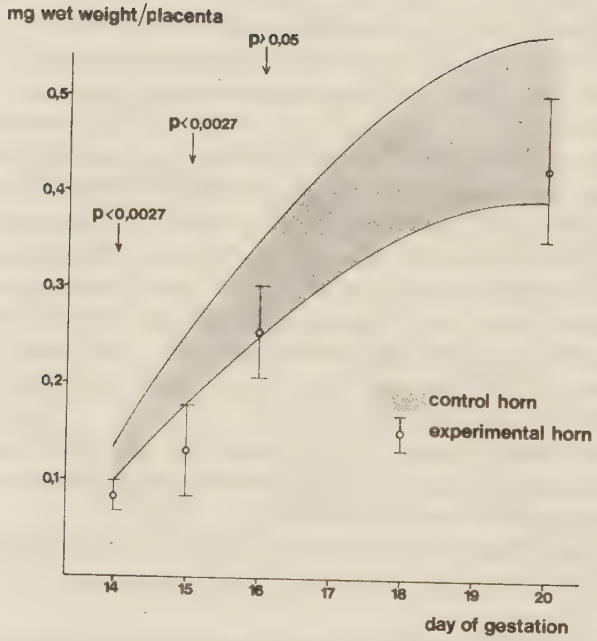

Abbildung 13

Feuchtgewicht der Placenta nach Ligation der uterinen Gefäße

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße operativ unterbunden. Es wurden nur Placenten, die lebende Feten versorgten, gemessen.

durch Untersuchungen über die Aufnahme von radioaktiv markierten Vorstufen aus dem mütterlichem Blut in das fetale Gewebe und durch Untersuchungen über den Stoffwechsel der fetalen Zellen gewonnen. Frühere Untersuchungen von KROWKE und Mitarbeitern (1971a, 1971b) zeigten, daß die Glukose eine geeignete Vorstufe für eine Vielfalt embryonaler Stoffwechselwege biete+ und somit Untersuchungen über diese Stoffwechselwege erlaubt. Als physiologisches Substrat und angeboten in einer physiologischen Konzentration (vgl. 2.3.) wird die Glukose von embryonalem und fetalem Gewebe aus dem mütterlichen Blut aufgenommen und metabolisiert. Diesen Weg der Glukose zu verfolgen, ermöglicht die radioaktive Markierung der Glukose im mütterlichen Blut mittels intravenöser Gabe von ^{14}C-Glukose. Die Anwendung von Glukose als Vorstufe hat weiterhin den Vorteil, daß nicht nur die Konzentration der Glukose, sondern auch die ihrer Metaboliten im physiologischen Bereich bleibt und mit keiner "pool-Veränderung" gerechnet werden muß. Der Stoffwechsel der embryonalen und placentaren Zellen wird also unter physiologischen Bedingungen untersucht. Ein typisches Beispiel für einen Versuch ist wiedergegeben in Abb. 2 und Tab. 4 und 5. In der Abb. 2 sind Anzahl und intrauterine Position der Implantation sowie Lage der Unterbindung mit der hierfür eingeführten Nomenklatur (2.9.) angegeben; jeweils die einzelnen Embryonen und die einzelnen Placenten wurden mit der unter 2.5.2. angegebenen Methode fraktioniert aufgearbeitet: in Tab. 4 bzw. 5 ist die Radioaktivität bezogen auf µg DNA pro Embryo oder pro Placenta angegeben. Der Mittelwert aus den Einbauraten der einzelnen Fraktionen wurde jeweils für das Kontrollhorn gebildet, die Einbauraten der einzelnen Fraktionen der Embryonen und Placenten im experimentellen Horn auf diesen errechneten Mittelwert prozentual bezogen. Für jede Position wurde aus den gemessenen und in Tab. 4 und 5 dargestellten Werten ein Mittelwert errechnet. Die sich so ergebenden Werte wurden in den Tab. 4 und 5 mit ihren Standardabweichungen aufgetragen.

3.4.1. Einbau von ^{14}C-Glukose in embryonales bzw. fetales Gewebe

Am Tag 12 - d.h. 24 Std. nach der Ligation - ist überraschenderweise keine verminderte Aufnahme von ^{14}C markierten Vorstufen aus dem mütterlichen Blut in den Embryo zu beobachten. Sowohl die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion wie auch der gesamte Einbau in den Embryo ist gegenüber den Embryonen im Kontrollhorn nicht vermindert, wie Abb. 14 ausweist. Es überrascht, daß dieser Befund auch für die Position C_1 und C_2, die der Ligation am nächsten liegen, zutrifft. Im Gegensatz zu den anderen Positionen findet sich aber ein verminderter Einbau von ^{14}C-Glukose in die Nukleinsäure-Fraktion in den Positionen C_1 und C_2 (Abb. 11). Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß nach Unterbindung der Arteria uterina, welche normalerweise zusammen mit der Arteria ovarica den Uterus versorgt, am Tag 12 - d.h. 24 Std. nach der Ligation - noch eine ausreichende Versorgung mit Glukose über die Arteria ovarica vorhanden ist. In keiner der uterinen Positionen des experimentellen Horns wird die von der Arteria ovarica zur Verfügung gestellte Glukose vermindert aufgenommen.

Während die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion sowie in der Protein-Lipid-Fraktion keine signifikante Unterschiede gegenüber den Embryonen im Kontrollhorn aufweist, ist der Einbau von ^{14}C-Glukose-Metaboliten in die Nukleinsäuren signifikant erniedrigt in der Position C_1 und C_2. In den Ligationsnächsten Positionen beträgt diese Verminderung des Einbaus 24 Std. nach der Ligation um 10 %. Da der DNA-Gehalt dieser Feten noch im Normbereich gefunden wird, hat sich diese Störung im Nukleinsäure-Metabolismus offenbar erst gegen Ende der 24 Std.-Periode ausgeprägt. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Versorgung mit einigen wachstumsnotwendigen Stoffen - möglicherweise Sauerstoff oder notwendigen Substraten - 24 Std. nach der Ligation der uterinen Gefäße - limitierend wird, obgleich eine normale Versorgung mit Glukose noch garantiert erscheint.

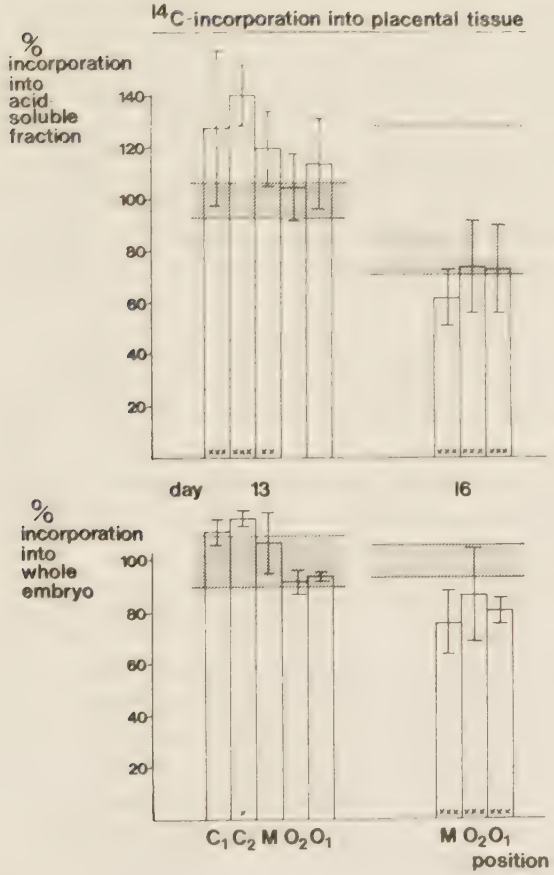

Abbildung 14

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße eines Horns operativ (vgl. 2.2.) unterbunden. 5 Std. vor der Schnittentbindung erhielten die Muttertiere 1 mCi. ^{14}C-Glukose intravenös. Die Embryonen wurden fraktioniert (2.4.3.2.) in einzelne Zellkomponenten. Die Meßwerte (Radioaktivität bezogen auf DNA-Gehalt in der Säurelöslichen Fraktion und in der Summe aller Fraktionen) sind angegeben als Prozent vom Mittelwert des jeweiligen Kontrollhorns. Definition der Positionen (C_1, C_2) siehe 2.8.

xxx $P < 0{,}0027$, xx $P < 0{,}01$, x $< 0{,}05$ Signifikanz gegenüber Feten im Kontrollhorn.

$\bar{M} \pm SD$ der Feten im Kontrollhorn

Am Tag 13 der Schwangerschaft - also 48 Std. nach der Ligation - weisen die in Position C_1 und C_2 überlebenden Feten eine generalisierte Störung ihres Zellstoffwechsels auf. Die Aufnahme bzw. der Einbau von ^{14}C-Glukose ist signifikant vermindert in der säurelöslichen Fraktion sowie in der Summe aller Fraktionen. In den beiden ligationsnächsten Positionen C_1 und C_2 beträgt der Einbau von ^{14}C-Glukose, verglichen mit dem Kontrollhorn, nur 80 %. Für die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion sowie für die Gesamtaktivität pro Embryo kann kein Unterschied aufgezeigt werden zwischen den Positionen C_1 und C_2.

Zur selben Zeit ist der Einbau von ^{14}C-Glukose-Metaboliten in die Nukleinsäure beträchtlich vermindert. Wenn dieser Parameter für die in Position C_1 überlebenden Feten untersucht wird, zeigt sich eine Einbaurate von nur ca. 50 % gegenüber den Kontrollen. Demgegenüber zeigen die Feten in der Position C_2 mit 80 % gegenüber den Kontrollen eine geringere Verminderung im Nukleinsäure-Stoffwechsel.

Der Einbau von radioaktiv markierter Glukose in den Nukleinsäuren steht in diesem Zeitabschnitt in guter Übereinstimmung mit dem DNA-Gehalt der Feten: die Embryonen im Kontrollhorn verzeichnen zwischen Tag 12 (mittlerer DNA-Gehalt pro Embryo 57 µg, vgl. Tab. 8) bis Tag 13 (mittlerer DNA-Gehalt pro Embryo 260 µg) eine mittlere Zunahme von DNA von 203 µg. In der Position C_1 des ligierten Horns enthält der Embryo nur ca. 70 % dieses mittleren DNA-Gehaltes, d.h. 183 µg gegenüber 261 µg. Der Embryo hat also zwischen Tag 12 und Tag 13 in der Position C_1 nur 120 µg DNA, d.h. 55 % des normalen Zuwachses (203 µg) synthetisiert. Diese aus der DNA-Zunahme errechneten 56 % stimmen gut überein mit den 57 % bei der Messung des Einbaus radioaktiv markierter Glukose in die DNA. Der ^{14}C-Einbau in die Nukleinsäure-Fraktion ist in der Position C_1 (57 %) stärker vermindert ($P < 0,01$) als in der Position C_2 (80 %). Der embryonale DNA-Gehalt ist in der Position C_2 unvermindert. Die Position C_2 weist also am Tag 13 dasselbe Phänomen auf, wie die Position C_1 am Tag 12, worin sich das

sukzessive positionsabhängige Fortschreiten der Schädigung zeigt. Die restlichen Positionen M, O_2 und O_1 weisen keine Beeinträchtigung am Tag 13 auf. Am Tag 16 - also 120 Std. nach der Ligation - haben die sich an den früheren Tagen abzeichnenden Störungen in der Regel auf die Feten in der Position C_1 und häufig auf die Feten in der Position C_2 eine letale Auswirkung gehabt.

In all diesen Untersuchungen unterschieden sich die Feten in den Positionen M und O nicht signifikant ($P > 0,05$) von den Feten im korrespondierenden Kontrollhorn. Die Untersuchungen zeigen, daß sich die Ligation der uterinen Gefäße erst etwa 24 Std. nach der Ligation auswirkt und daß sich alle Auswirkungen bis etwa 48 Std. nach der Ligation abzeichnen.

Die Experimente mit ^{14}C-Glukose zeigen deutlich, daß mit Hilfe biochemischer Parameter eine fetale Schädigung 24 Std. vor der lethalen Auswirkung gezeigt werden kann. Darüber hinaus ist deutlich, daß sich die Ligation der uterinen Gefäße in typischen uterinen Positionen auswirkt und Feten desselben Wurfes in anderen Positionen unangefochten bleiben.

Am Tag 16 der Schwangerschaft - also 120 Std. nach der Ligation - ist die Aufnahme von ^{14}C-Glukose in die säurelösliche Fraktion signifikant geringer (10 - 20 %) auch in den Feten, die die uterinen Positionen M, O_1 und O_2 besetzen. Die geringere Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion ist vielleicht Ausdruck eines verminderten arteriellen Druckes, von dem MOLL und KÜNZEL (1971) nach der Unterbindung der Arteria uterina beim Meerschweinchen berichteten: Sofort nach Okklusion der Arteria uterina des Meerschweinchens in späten Gestationsstadien senkte sich der Blutdruck in der Arteria uterina in Höhe der Position C_1 um 50 %, in Höhe der Position M um 30 % und in Höhe der Position O_1 um 25 %. Während die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion geringer war, waren die anderen untersuchten Parameter - Feuchtgewicht, DNA-Gehalt sowie Aktivität in der DNA - im Normbereich. Also auch bei um 10 % verringerter Aktivität in der säurelöslichen Fraktion, d.h. bei verringertem Glukose-Substratdruck, welcher

möglicherweise Folge eines verminderten arteriellen Druckes ist, können die Feten in der Position M, O_2 und O_1 normal wachsen.

3.4.2. Einbau von ^{14}C-Glukose-Metaboliten in placentares Gewebe

Zusätzliche Information wurde durch Experimente erhalten, in denen die Aufnahme und der Einbau von ^{14}C-Glukose in placentares Gewebe gemessen wurde. Bei der Ratte findet die Placentation am Tag 12 statt. Zu diesem Zeitpunkt ist es schwierig, makroskopisch placentares und uterines Gewebe zu trennen. Daher wurden die Untersuchungen an Placenta-Gewebe erst an den Tagen 13 und 16 vorgenommen (Abb. 15 und 16). In Abb. 17 sind die Ergebnisse der auffälligsten Positionen C_1 und C_2 zusammengestellt. Überraschenderweise zeigt sich eine signifikante Erhöhrung der Aufnahme von ^{14}C markierter Glukose in die säurelösliche Fraktion der Placenta. Diese Aufnahmesteigerung von ^{14}C-Glukose wird zudem deutlich, wenn die gesamte Aufnahme und die Summe der Einbaureaktionen in die Placenta gemessen werden.

Im Gegensatz zu diesen Befunden kann keine signifikante Abweichung von den Kontrollen gezeigt werden, wenn der Einbau in die Nukleinsäuren oder in die Lipid- und Proteinfraktion gemessen wird. Der placentare DNA-Gehalt ist zu dieser Zeit im Normbereich.

Diese Befunde zeigen, daß die Placenten nahe der Ligation eine größere Menge an Glukose aufnehmen als die anderen Placenten des ligierten Horns oder die Placenten im Kontrollhorn. Da kein Anwachsen der Synthese-Rate von Makromolekülen bezogen auf DNA beobachtet werden kann und da die Placenten nicht schneller wachsen, mag man berechtigt sein anzunehmen, daß für die gesteigerte Glukose-Aufnahme der hypoxische Zustand des Gewebes verantwortlich ist und die zusätzlich aufgenommene Glukose durch eine gesteigerte Glykolyse verbraucht wird. Es kann nicht entschieden werden, ob diese gesteigerte Glukose-Aufnahme einen Kompensationsmechanismus darstellt, welcher eine normale Versorgung von Embryo bzw. Fet unter ungünstigen Bedingungen erlaubt. Ein gesteigerter Glukose-Verbrauch wurde, wie an vielen

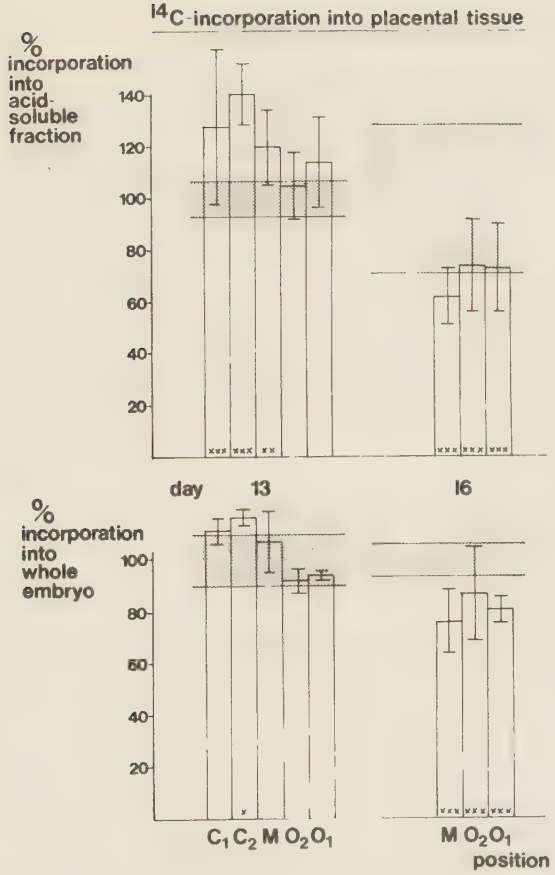

Abbildung 15

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße eines Hornes operativ (vgl. 2.2.) unterbunden. 5 Std. vor der Schnittentbindung erhielten die Muttertiere 1 mCi ^{14}C-Glukose intravenös. Die Placenten wurden fraktioniert (2.4.3.2.) in einzelne Zellkomponenten. Die Meßwerte (Radioaktivität bezogen auf DNA-Gehalt in der Säurelöslichen Fraktion und in der Summe aller Fraktionen) sind angegeben als Prozent vom Mittelwert des jeweiligen Kontrollhorns. Definition der Positionen (C_1, C_2) siehe 2.8.

xxx $P < 0{,}0027$, xx $P < 0{,}01$, x $< 0{,}05$ Signifikanz gegenüber Feten im Kontrollhorn.

$\bar{M} \pm SD$ der Feten im Kontrollhorn

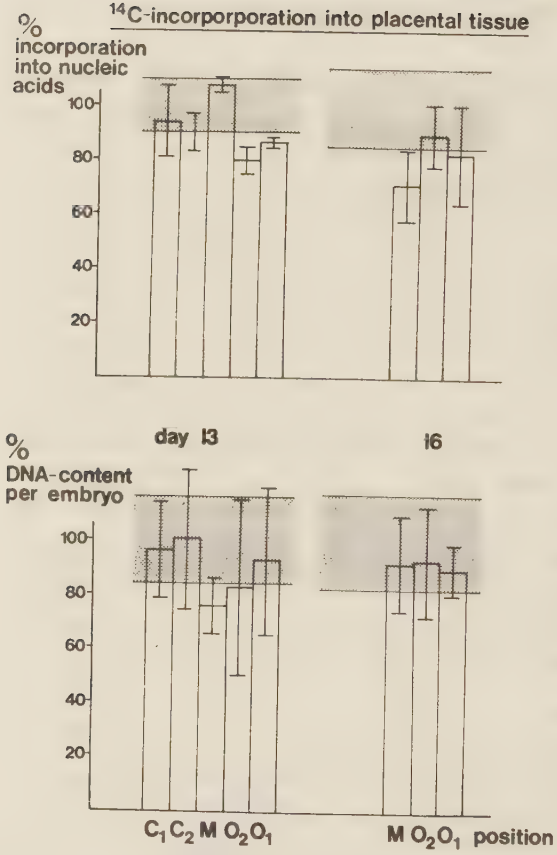

Abbildung 16

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße eines Horns operativ (vgl. 2.2.) unterbunden. 5 Std. vor der Schnittentbindung erhielten die Muttertiere 1 mCi ^{14}C-Glukose intravenös. Die Placenten wurden fraktioniert (2.4.3.2.) in einzelne Zellkomponenten. Die Meßwerte (Radioaktivität bezogen auf DNA-Gehalt in der Nukleinsäure-Fraktion, DNA-Gehalt) sind angegeben als Prozent vom Mittelwert des jeweiligen Kontrollhorns. Definition der Positionen (C_1, C_2) siehe 2.8.

xxx P $<$ 0,0027, xx P $<$ 0,01, x $<$ 0,05 Signifikanz gegenüber Feten im Kontrollhorn.

$\bar{M} \pm$ SD der Feten im Kontrollhorn

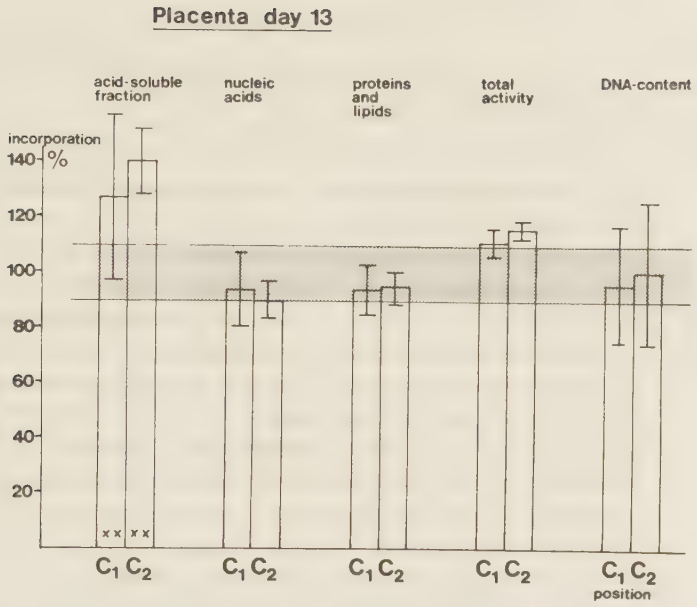

Abbildung 17

Am Tag 11 wurden die uterinen Gefäße eines Horns operativ (vgl. 2.2.) unterbunden. 5 Std. vor der Schnittentbindung erhielten die Muttertiere 1 mCi ^{14}C-Glukose intravenös. Die Embryonen wurden fraktioniert (2.4.3.2.) in einzelne Zellkomponenten. Die Meßwerte (Radioaktivität bezogen auf DNA-Gehalt in den einzelnen Zellkomponenten, DNA-Gehalt) sind angegeben als Prozent vom Mittelwert des jeweiligen Kontrollhorns. Definition der Positionen (C_1, C_2) siehe 2.8.

xxx $P < 0{,}0027$, xx $P < 0{,}01$, x < 0,05 Signifikanz gegenüber Feten im Kontrollhorn.

M $\pm$ SD der Feten im Kontrollhorn

anderen Geweben (REGEN 1964) auch an Placenta-Schnitten von ROUX und VILLEE (1960), FRIEDMAN und Mitarbeiter (1960, 1970) unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen (vgl. auch SZABO und GRIMALDI 1970).

3.5. FEINSTRUKTUR VON EMBRYO UND PLACENTA AM TAG 13 NACH LIGATION DER UTERINEN GEFÄSSE

3.5.1. Normale Feinstruktur des Embryo am Tag 13

Am Tag 13 zeigen sich zwar deutlich elektronenmikroskopisch faßbare Differenzierungserscheinungen, jedoch zeigen die Zellen in Abhängigkeit von der Differenzierungsrichtung gemeinsam morphologische Kennzeichen, die typisch für diese frühe Entwicklungsphase sind (vgl. Abb. 18): die Kernplasma-Relation ist zugunsten des sehr großen Kerns verschoben; das Karyoplasma ist aufgelockert und enthält kleine verdichtete Chromatinbezirke. Ein oder zwei große Nucleoli heben sich deutlich hervor; sie enthalten in verschlungener, bandförmiger Anordnung dichte filamentäre Chromatinbezirke und granuläre Strukturen. Dazwischen liegen helle Bezirke, die sog. Nucleolus Vacuole.

Das Cytoplasma ist charakterisiert durch die große Zahl freier Ribosomen, die zu Polysomen in Ketten-Ringen- oder -haufenform gruppiert sind. Die höchste Zahl von Ribosomen, die in einer Schnittebene pro Polysom gezählt werden kann, liegt bei 30. Daneben liegen einige runde bis ovale Mitochondrien, die nur wenig Matrix und eine geringe Anzahl an Christae enthalten. Allerdings finden sich zu diesem Zeitpunkt an manchen Stellen bereits Unterschiede in der Mitochondrien-Morphologie in Abhängigkeit von der Differenzierungsrichtung. Leber, Herzmuskel, Nebenniere z.B. enthalten bereits große christaereiche Mitochondrien. Als weitere, immer wiederkehrende Struktur ist das rauhe endoplasmatische Reticulum zu nennen, dessen Hohlräume in unterschiedlicher Zahl und Länge in fast allen embryonalen Zellen vorkommen. Der Golgiapparat ist klein und vom vesikulären Typ. Mit beginnender Differenzierung treten auch schon die ersten

differenzierungsspezifischen, makromolekularen Strukturen auf: Actin, Myosin, Tonofilamente, Mikrotuboli, Neurofilamente und Neurotuboli.

3.5.2. Die embryonale Feinstruktur am Tag 13 nach Ligation der uterinen Gefäße

Am Tag 13 + 6 zeigen die ligationsnächsten, nicht resorbierten Embryonen beginnende morphologische Veränderungen, die mit einer Schwellung der Mitochondrien beginnen (Abb. 19, 20). Typisch ist dabei die Vergrößerung der inneren Mitochondrienkammer ohne Verbreiterung der äußeren Mitochondrienkammer, wodurch es zum Verstreichen bzw. zur Peripherstellung der Christae kommt, die nunmehr stummelförmig in den leeren Matrixraum ragen. Die typische elektronendichte Matrix ist verschwunden, es finden sich locker verteilte, feingranuläre Strukturen. Diese Mitochondrienveränderung wurden auch an anderen Geweben unter Anoxie beobachtet (MERKER et al. 1964, WEDELL et al. 1965, DAVID 1964). Ein weiterer Hinweis auf den Schädigungsvorgang ist die Diskontinuität der Zellmembran an vielen Stellen, wovon nicht alle Zellen gleichförmig betroffen sind. Das Cytoplasma ist häufig aufgelockert und die Zahl der freien Ribososmen verringert. Das Verhältnis der Ribosomen zu Polysomen scheint dagegen nicht betroffen zu sein. Die Kernstruktur weist keine Veränderungen auf. Am Tag 13 + 6 Stunden zeigen die übrigen cytoplasmatischen Hohlräume noch keine Schwellung.

3.5.3. Die normale placentare Feinstruktur am Tag 13

Die Placenta hat sich zwischen Tag 11 und 13 zu einem funktionellen Organ entwickelt (Abb. 21). In dieser Zeit sind an den Trophoblastenzellen typische resorbierende und eiweißsezernierende Endothelzellen entstanden. Morphologisch spiegelt sich das in einem Reichtum an Hohlräumen des endoplasmatischen Reticulums wieder und in einer Oberflächenvergrößerung zu den mütterlichen Bluträumen hin. Hier finden sich Fortsatzbildungen und reichlich Vesikulationsprozesse. Die Mitochondrien sind zwar zahlreich, aber

klein und christaearm, zahlreiche freie Ribosomen und ein mittelgroßer Golgiapparat kommen vor. Das extraembryonale Mesenchym besteht aus noch wenig differenzierten typischen Mesenchym-Zellen. Neben wenigen Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Reticulums herrschen hier noch freie Ribosomen vor.

Die Kernstruktur entspricht den morphologischen Verhältnissen der Embryonalzellen, die oben geschildert wurden. Die Riesenzellen, die an der Mutter-Embryo-Grenze liegen, sollen hierbei nicht berücksichtigt werden.

3.5.4. Die placentare Feinstruktur nach Ligation der uterinen Gefäße am Tag 13

Auch die Feinstruktur der Placenten, die auch morphologisch geschädigte Embryonen versorgten, weisen keine morphologisch faßbarenVeränderungen auf (Abb. 21). Zudem gibt es keine Anhaltspunkte für Placenta-Infarkte oder Infarzierungen.

3.5.5. Veränderungen der Feinstruktur und ihre biochemische Funktion

Die verminderten Einbauraten am Tag 13 im Embryo spiegeln sich wieder in den morphologischen Veränderungen. Da nicht alle Zellen die gleichen morphologischen Veränderungen zeigen, ist es nicht möglich, die durch Einbau-Untersuchungen gemessenen Synthese-Leistungen der geschädigten Ultra-Struktur der Zelle zuzuweisen, zumal biochemisch die Leistung einer Summe von Zellen gemessen wurde, von denen die einen noch biochemisch intakt sein könnten, die anderen hingegen ohne biochemische Stoffwechselaktivität.

Die elektronenmikroskopischen Bilder der geschädigten Embryonen am Tag 13 zeigen nicht das Bild des abgeschlossenen Zelltodes, dem noch ein Schwellen auch der übrigen cytoplasmatischen Hohlräume wie des endoplasmatischen Reticulums, des Golgiapparates und der perinuclearen Cisterne vorangehen würde, bevor auch am Kern pyknotische Vorgänge mit Chromatin-Verklumpungen beginnen würden.

Legenden zu Abb. 18, 19, 20, 21

Abb. 18 Rattenembryo Tag 13

Neuralepithel mit Zentralkanal (Z) ohne morphologische Veränderungen M = Mitochondrien, N = Nucleolus mit aufgelockertem Karyoplasma und Nucleolus (No), Ch = angeschnittenes Chromosom einer Zelle in Mitose. X = endoplasmatisches Reticulum, ↓ = Diplosom, ⇩ = Lysosom
O = zahlreiche Polysom ZM = Zellmembran
I = Interzellularspalt Vergrößerung 1 : 21000

Abb. 19 Rattenembryo Tag 13 nach Ligatur der uterinen Gefäße

Neuralepithel mit beginnender Fortsatzbildung (F), Zellmembran an zahlreichen Stellen geplatzt (↙) einige Mitochondrien (M) leicht geschwollen, I = Interzellularraum, N = Nucleus, G = Golgi-Apparat, Vergrößerung 1 : 35000

Abb. 20 Rattenembryo Tag nach Ligatur der uterinen Gefäße

Neurablasten mit Mitochondrien (M), die eine deutliche Schwellung der inneren Mitochondrienkammer aufweisen. Einige Zellen mit aufgelockertem Cytoplasma und weniger Ribosomen (Z_1) N = Nucleus, ↙ = geplatzte Zellmembran Vergrößerung 1 : 21000

Abb. 21 Placenta Tag 13

Trophoblasten zählen an der Placenta mit reichlich rauhem endoplasmatischen Reticulum (X), Golgi-Apparat (G), kleinere Lysosomen, kleine Mitochondrien (✱), N = Nucleus, I = Interzellularraum mit Interzellularsubstanz, O = freie Ribosomen, ⇩ = Lysosomen
Vergrößerung 1 : 21000

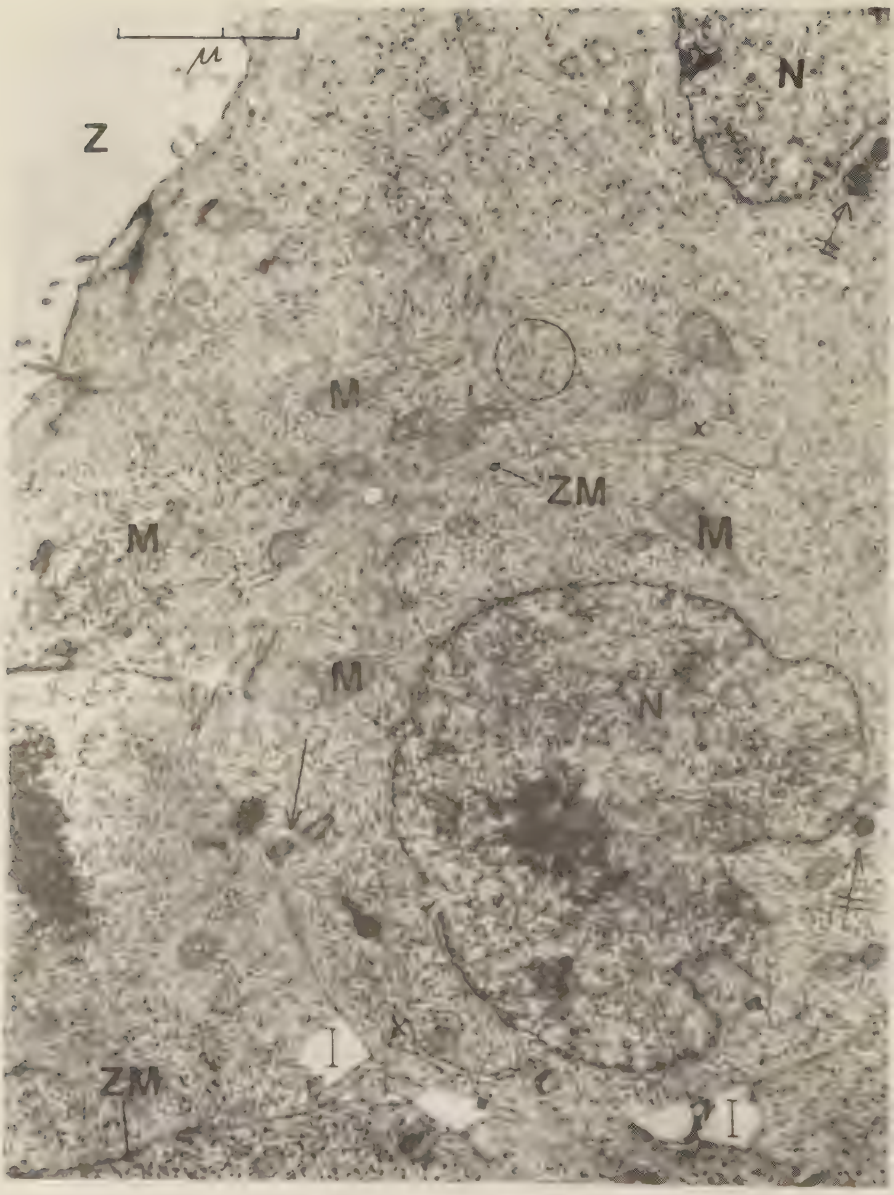

Abb. 18

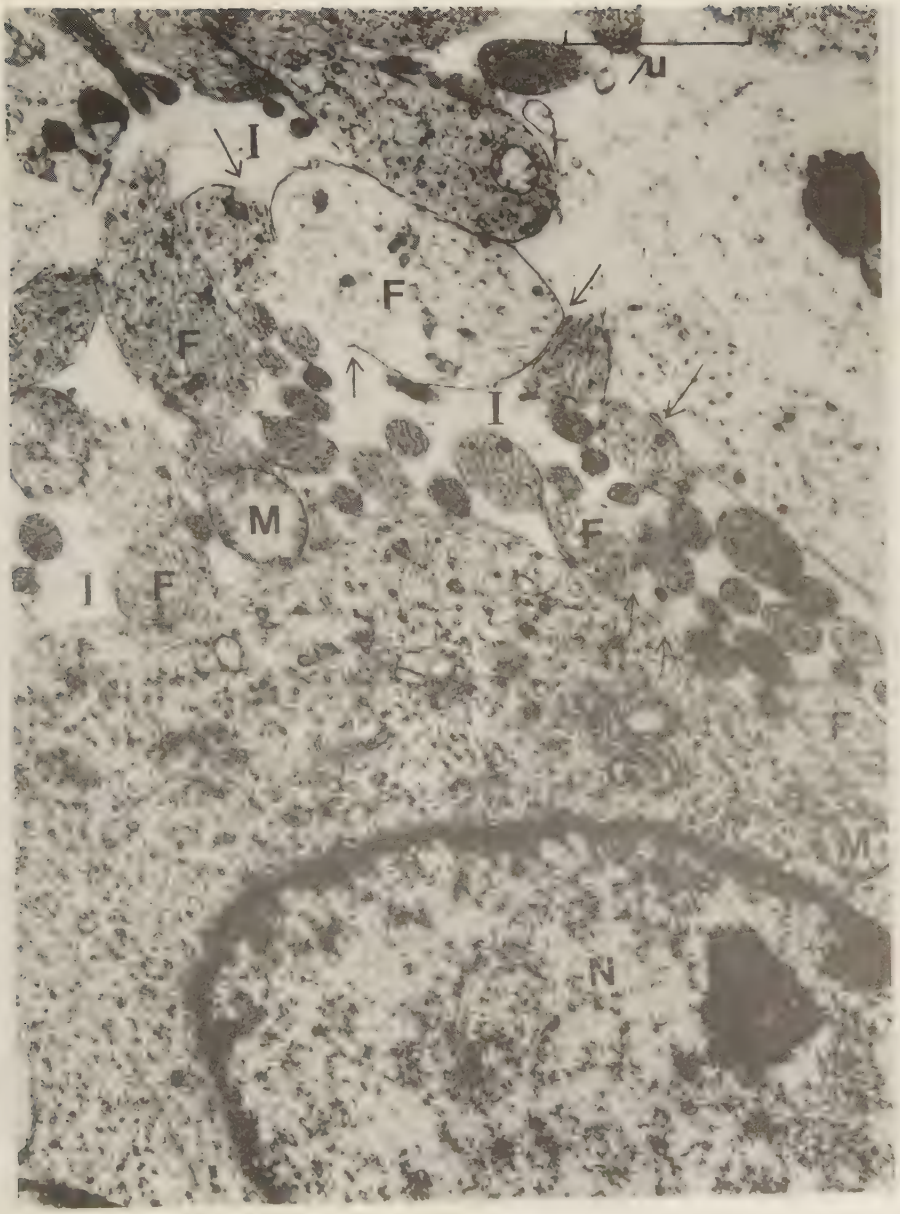

Abb. 14

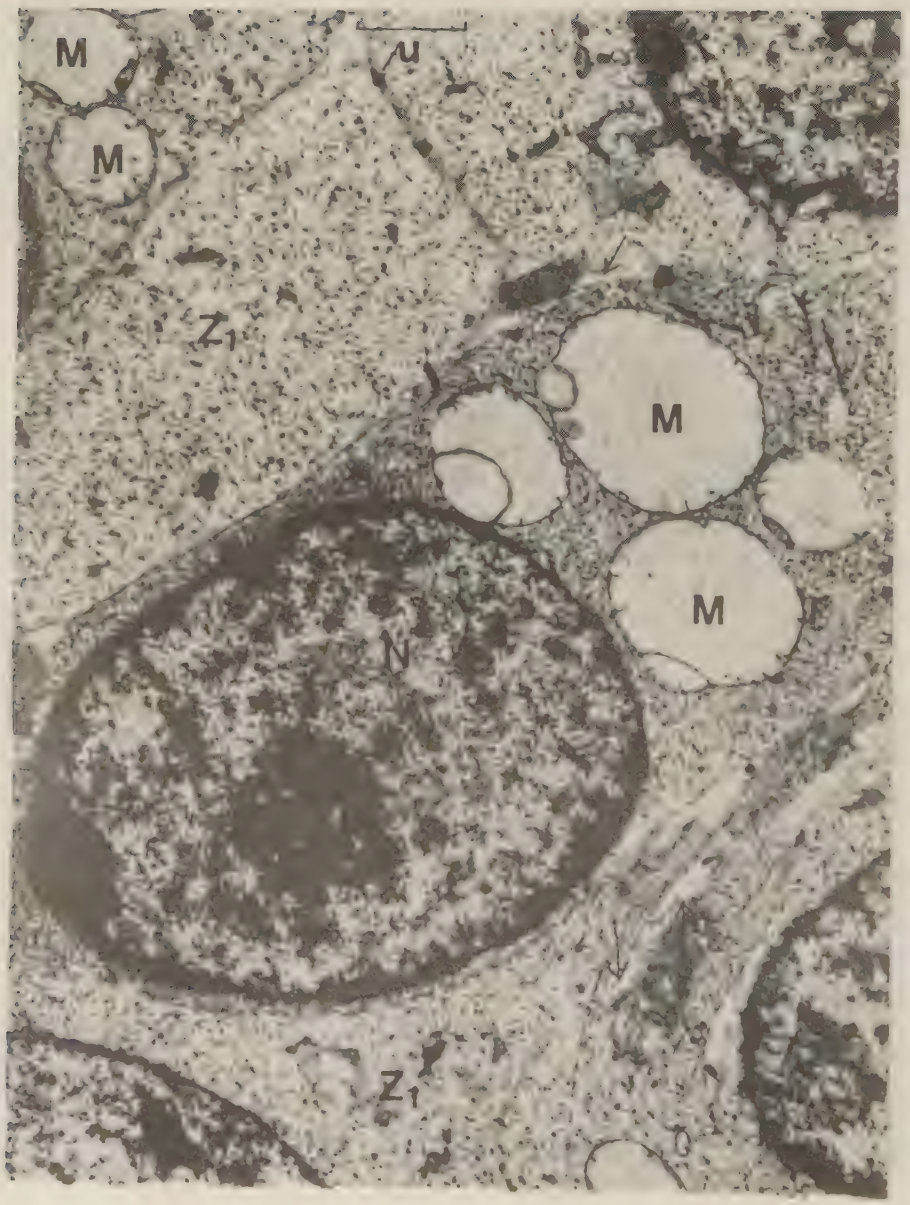

Abb. 20

Abb. 21

3.6. TERATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die uterinen Gefäße eines Hornes wurden bei einer Gruppe von 23 Tieren am Tag 11 unterbunden. Am Tag 20 wurden die Tiere durch Kaiserschnitt entbunden, Feuchtgewicht von Placenten und Feten bestimmt und die Feten - nach Aufhellen und Anfärben wie unter 2.7. beschrieben - makroskopisch auf Mißbildungen und Skelettanomalien untersucht.

Wie BARR und BRENT (1970) fanden wir eine positionstypische Retardierung im Feuchtgewicht der Feten. Diese Feuchtgewichtsverminderung wurde bereits im Abschnitt 3.3. besprochen. Zum Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Autoren, die die uterinen Gefäße an verschiedenen Tagen unterbanden, wurde das mittlere Fetalgewicht der im experimentellen Horn überlebenden Feten bezogen auf das mittlere Gewicht der Feten im Kontrollhorn. Tab.10 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse. Einschränkend sei zu unseren Ergebnissen gesagt, daß jeweils das implantationsreichere Horn unterbunden wurde und somit die mit dem "Litter"-Effekt einhergehendenGewichtsverminderungen in unseren Untersuchungen einen zu hohen Wert für die Retardierung vortäuschen könnten. Trotz der so beschränkten Aussagemöglichkeit der Literaturübersicht läßt sich ersehen, daß der Retardierungseffekt um so größer ist, je später die Ligation in der Schwangerschaft durchgeführt wird (Tab.10).

Wie schon BARR und BRENT (1970) konnten auch wir nach Ligation der uterinen Gefäße keine typische Mißbildung beobachten. Tab. 9 führt die Ergebnisse der Untersuchungen am Skelett der Rattenfeten auf. Ein signifikanter Unterschied wurde lediglich beobachtet in der Zahl der anomalen Wirbelkörper. Bei der makroskopischen Betrachtung schien auch der Schädel vergrößert, was in der Tabelle mit starkem und leichtem "Makrocephalus" abgestuft eingeordnet ist. Für die jeweils ligationsnächste Position ließ sich im Vergleich zu den Kontrolltieren bei den Symptomen leichter und starker "Makrocephalus" ein signifikanter Unterschied errechnen ($P = 0{,}005$).

Skeletanomalien nach Ligatur der uterinen Gefäße

Mißbildung			(LH) ligiertes Horn L n = 22	(LH) ligiertes Horn M n = 22	(LH) ligiertes Horn O_1 n = 21	alle Positionen n = 88	(KH) Kontrollhorn n = 91	(UK) unbehandelte Kontrolle n = 152	K Kontr.Horn+ unbehand. Kontrolle n = 243	P für L≠K	P für LH≠K
Schädel	Knochen	eines	5 %	-	-	1 %	9 %	10 %	10 %	> 0,05	0,02
	unvollständig verknöchert.	mehrere	23 %	14 %	5 %	11 %	15 %	20 %	20 %	> 0,05	> 0,05
	unverknöchert.		5 %	9 %	10 %	6 %	2 %	3 %	3 %	> 0,05	> 0,05
	Macrocephalus	stark	23 %	5 %	14 %	15 %	4 %	8 %	7 %	0,02	> 0,05
		leicht	23 %	20 %	14 %	27 %	14 %	12 %	13 %	> 0,05	> 0,05
		stark + leicht	46 %	25 %	28 %	42 %	18 %	20 %	20 %	0,01	0,002
Wirbelsäule	WK asym.	eines	9 %	-	-	3 %	2 %	5 %	4 %	> 0,05	> 0,05
		mehrere	5 %	-	-	1 %	-	1 %	-	> 0,05	> 0,05
	W gespalten.	eines	-	-	-	1 %	2 %	-	1 %	> 0,05	> 0,05
		mehrere	5 %	-	-	2 %	-	-	-	> 0,05	> 0,05

Methode siehe 2.7.

LH = Horn, dessen uterinen Gefäße am Tag 11 der Schwangerschaft unterbunden wurden.

L = ligationsnächster lebender Fet am Tag 20

M, O_1 = siehe 2.8.

KH = Kontrollhorn, korrespondierendes Horn zu LH

UK = unbehandelte Kontrolltiere

K = Zusammenfassung von KH und UK; zwischen KH und UK in keinem Parameter signifikanter ($P < 0,05$) Unterschied.

P = mit x^2-Test errechnet

3.7. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DES ZEITLICHEN ABLAUFS EMBRYOTOXISCHER EFFEKTE NACH UNTERBINDUNG DER UTERINEN GEFÄSSE

WIGGLESWORTH (1964), BARR et al. (1970), ROUX et al. (1970), TORDET-CORIDROIT et al. (1969) und HOHENAUER (1970) unterbanden die uterinen Gefäße zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft; am Tag 20 untersuchten sie die Wirkung dieser Ligatur auf den Fet. Das in unseren Versuchen beobachtete sukzessive Absterben der Feten, dem ein verminderter Einbau von ^{14}C-Glukose vorausgeht - wobei eine Verminderung bis 40 % noch mit dem Leben vereinbar und teilweise reversibel zu sein scheint - zeigt, daß die Schädigung des Feten nicht allein akut durch das Unterbrechen des Blutstroms erklärbar ist, sondern daß die Schädigung über einen längeren Zeitraum entsteht. Im Verlauf der Schwangerschaft steigt der Bedarf des Embryo an Sauerstoff (BARCROFT et al. (1933), METCALFE (1967, 1970), MAKOWSKI (1968), COTTER et al. (1969a, 1969b, 1970) und Substraten. Bei plötzlichem Wegfall der Versorgung durch die Arteria uterina am Tag 11 verringert sich der Blutzufluß um mindestens die Hälfte. Die geringe Auswirkung dieses drastischen Eingriffs innerhalb der ersten 24 Std. nach der Ligatur zeigt an, daß entweder die Empfindlichkeit des Embryo zwischen Tag 11 und 12 auf Mangelversorgung gering ist oder daß die Blutversorgung überschüssig war. FRANKLIN (1960, 1964), BRENT (1960, 1968), FEILD et al. (1960) konnten nach 2 1/2 stündigem Abklemmen der Arteria uterina sowie der Arteria ovarica am Tag 11 kaum eine Wirkung auf die am Tag 21 untersuchten Feten zeigen. Am Tag 13 und 14 findet sich jedoch bei gleicher Dauer der Ischämie ein Ansteigen in der fetalen Mortalität. Auch eine spätere Ligatur der Arteria uterina am Tag 16 (WIGGLESWORTH 1964, HOHENAUER 1970) und am Tag 17 (BARR und Mitarbeiter 1969, ROUX 1971) führt zu einer höheren Retardierungsrate (etwa 20 % bzw. 30 %) als wenn die Ligation am Tag 9 (BARR 1969) oder am Tag 11 durchgeführt wird (etwa 10 % Retardierung). Das bedeutet also, je später in der Gestation die Arteria uterina unterbunden wird, desto stärker sind die Auswirkungen (vgl. hierzu

Tabelle 10

Auswirkung der Ligatur der uterinen Gefäße auf das Geburtsgewicht

author	day of ligation	number of mother animals	mean fetalweight (g) day 20 or 21 control horn	mean fetal weight (g) experimental horn	% retardation
BARR et BRENT	9	17	5,08 ± 0,36	4,70 ± 0,36	8,0
EPPING et al.	11	21	2,99 ± 0,33	2,59 ± 0,44	13,3
HOHENAUER et al.	16	5	5,7 ± 0,06	4,6 ± 0,12	19,4
WIGGLESWORTH	16	22	3,42 ± 0,47	2,81 ± 1,02	17,8
BARR et al.	17	14	4,57 ± 0,56	3,16 ± 0,45	32,0
ROUX et al.	17	12	5,35 ± 0,75	3,37 ± 0,60	35,9

Der Vergleich der Ergebnisse von BARR und BRENT (1970), HOHENAUER und OH (1970), WIGGLESWORTH (1964), ROUX, TORDET-CORIDROIT und CHANEZ (1970) gründet sich auf folgende Berechnung: Das mittlere Gewicht von allen ligierten Horn überlebenden Feten wurde als Prozent vom mittleren Gewicht der Feten im Kontrollhorn ausgedrückt. Der Unterschied in den absoluten Gewichtswerten geht auf unterschiedliche Tötungstermine (Tag 20, 21, 22) und die Verwendung verschiedener Rattenstämme (Wistar, Holtzman, Sprague Dawley und Sherman) zurück. In unseren Versuchen wurde stets das ligationsreichere Horn ligiert (vgl. Abb. 7); durch diese Selektion dürfte die angegebene Retardierung einen zu hohen Wert aufweisen.

Tab. 10). Für die Maus zeigten SENGER und Mitarbeiter in der frühen Embryonalentwicklung dieselbe Gesetzmäßigkeit.

Die sich vom Tag 13 bis 16 erhöhende Absterberate nach der Ligatur am Tag 11 zeigt demnach an, daß die Versorgung des Embryos kritisch wird oder daß Kompensationsmöglichkeiten nur begrenzt zur Verfügung stehen. So wird die Blutversorgung in dieser Phase limitierend. Nach Unterbindung kann das verminderte Blutangebot durch Revaskularisierung oder verstärktes Wachstum der Arteria ovarica (BARR 1969) nicht schnell genug ausgeglichen werden.

Für eine Veränderung der Empfindlichkeit könnte man Stoffwechselunterschiede des Embryos zwischen Tag 12 und 14 verantwortlich machen. Für den Embryo sind solche Unterschiede im Ausmaß der Protein-Synthese (WIEDEMANN 1971, BASS und WIEDEMANN 1972, OERTER und BASS 1972), der Lipid-Synthese (BALLARD und HANSEN 1967, FAEN und SCOW 1966, GOLDHAR 1968, PREUSKY 1970), der Nukleinsäure-Synthese und Laktatbildung (NEUBERG et al. 1970, 1971) sowie in der Substrat-Stimulierbarkeit der Atmung (BASS(et al.)1972) bekannt. Eine Entscheidung darüber, welche solcher Stoffwechselveränderungen für die verschiedene Empfindlichkeit gegenüber einer Ischämie (INGALLS et al. 1950, 1953, MURAKAMI 1955, CURLEY 1957, WERTHEMANN 1950) verantwortlich sein könnten, ist zur Zeit noch nicht möglich.

Veränderungen der embryonalen Entwicklung können aber auch resultieren aus Veränderungen der Placenta-Leistung oder Stoffwechseländerungen des Muttertieres. Direkte und indirekte Einwirkungen auf den Embryo lassen sich im in-vivo Experiment schwer unterscheiden. Der DNA-Zuwachs der Placenta ist am Tag 13 größer als der des Embryos. Die Zellen weisen aber morphologisch in der Placenta keine und im Glukose-Einbau relativ geringgradige Veränderungen nach der Ligation auf, obwohl sie von der Ligatur der Arteria uterina in ähnlicher Weise wie die Zellen des Embryos betroffen sind. Die Blutversorgung der ligationsnächsten Positionen reicht aus, um das Wachstum und

die Differenzierung der Placenta zu erhalten. Der nachgeschaltete Embryo wird dagegen geschädigt.

Das sukzessive, positionsabhängige Betroffensein von der Schädigung zeigt an, daß mit zunehmender Entfernung vom Ursprung der nach Ligation der Arteria uterina den Embryo allein versorgenden Arteria ovarica ein Gefälle in der Suffizienz der Blutversorgung besteht, was die hämodynamische Theorie der Blutversorgung (McLAREN 1960) stützt.

4. EINFLUSS UTERINER FAKTOREN AUF DAS WACHSTUM VON RATTENEMBRYONEN

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. VERGLEICH DER BEIDEN UTERUSHÖRNER UND IHRE GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG

4.1.1. Anzahl der Implantation

Es wurde die Verteilung von Implantationen für den Rattenstamm SW 69 an 41 Tieren am Tag 13 ermittelt. Für beide Hörner ergibt sich eine im Mittelwert und in der Standardabweichung nicht signifikant unterschiedliche Binominialverteilung (Abb. 22). Zwischen der Implantationszahl in den beiden Hörnern besteht für den Rattenstamm SW 69 eine negative Korrelation. Diese Korrelation kann graphisch - wie in Abb. 23 - dargestellt werden, wenn man die mittlere Implantationszahl im korrespondierenden Horn (Ordinate) gegen eine bestimmte Implantationszahl im Horn aufträgt. Die Beziehung zwischen der Implantationszahl in den beiden Hörnern läßt sich als Funktion ausdrücken:

$$y = - 0{,}36\ x + 7{,}3$$

Die symmetrische Verteilung von Embryonalanlagen zwischen den beiden Hörnern, d.h. die gleiche Zahl von Embryonalanlagen in den jeweils korrespondierenden Hörnern, ist nicht bevorzugt. Die größte Differenz in der Implantationszahl zwischen den Hörnern waren 7 Feten, die mittlere Differenz war 1,99.

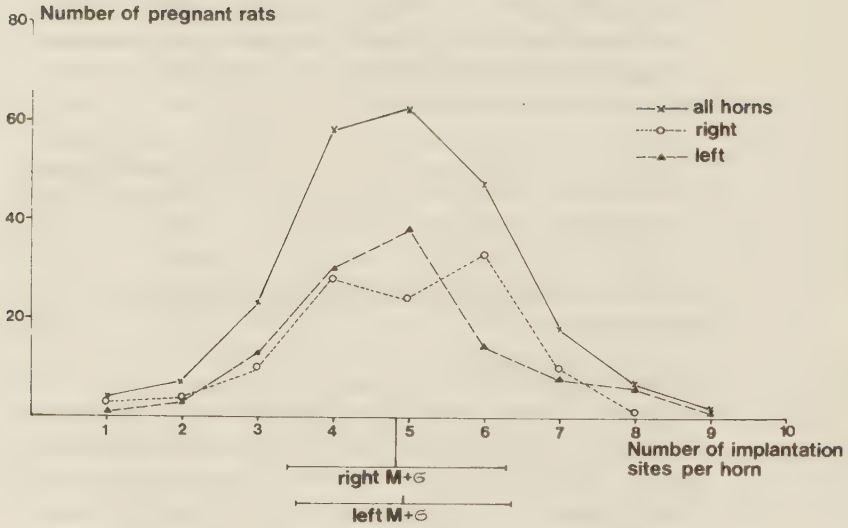

Abbildung 22

Normalverteilung der Zahl der Implantationen im Horn

In 114 Muttertieren,d.h. 228 Hörnern, wurde am Tag 13 die Zahl der Implantationen festgestellt.

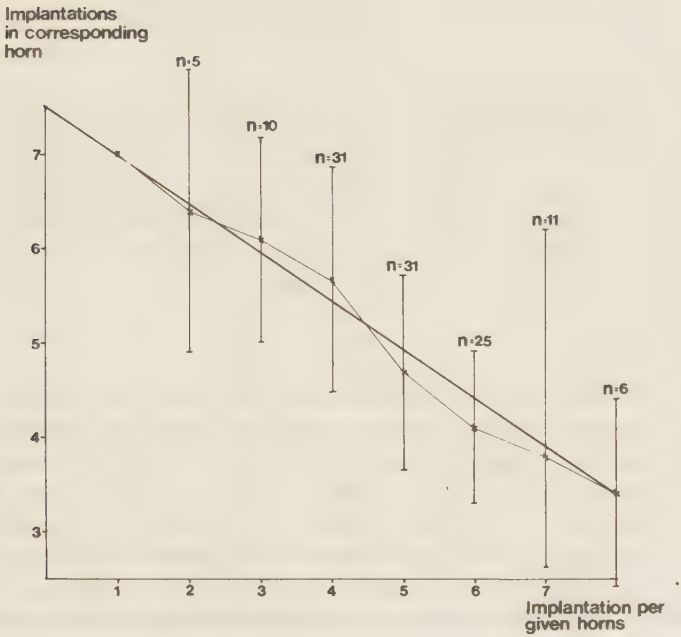

Abbildung 23

Korrelation zwischen der Implantationszahl der korrespondierenden Hörner

Die mittlere Implantationszahl im korrespondierenden Horn wurde an den jeweils ausgesuchten Hörnern mit gleicher Implantationszahl am Tag 13 ermittelt. Die Beziehung zwischen der Implantationszahl der beiden Hörner entspricht der Funktion

$$y = -0{,}36\,x + 7{,}3$$

y = Implantationszahl im korrespondierenden Horn

x = bestimmte Implantationszahl

m = - 0,36 Steigung

4.1.2. Zahl der Resorptionen

Die Resorptionsrate zeigt zwischen den beiden Hörnern keine Unterschiede (Abb. 11).

4.1.3. ^{14}C-Glukose Einbau

21 Muttertieren wurde, wie unter 2.3. geschildert, intravenös ^{14}C-Glukose verabreicht. Es wurde der Einbau von ^{14}C-Glukose-Metaboliten in die verschiedenen embryonalen Zellfraktionen untersucht. Vergleicht man den Einbau in die verschiedenen embryonalen Zellkomponenten der beiden Uterushörner, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 11).

4.1.4. Diskussion

Da sich für die beiden Uterushörner keine Heterogenität in Implantationszahl, Resorptionsrate, Stoffwechselaktivität am Tag 13 und Fetalgewicht am Termin nachweisen läßt, ist man berechtigt, die beiden Uterushörner sowie die ihnen entstammenden Embryonen und Feten als gleichwertig anzusehen. Dies gestattet Experimente, bei denen in demselben Muttertier das eine Horn experimentellen Veränderungen unterzogen wird, wogegen das andere als Kontrolle dient. Dieser Versuchsanordnung bedient man sich insbesondere bei Blastocysten-Transplantationen (vgl. z.B. NOYES 1961), bei Unterbrechung der Blutzufuhr mit der von FRANKLIN und BRENT (1960) angegebenen Methode und bei Ligationsversuchen. Im Gegensatz zu den Befunden an dem von uns verwendeten Rattenstamm teilte McLAREN (1963) für seinen Maus-Stamm mit, daß das rechte Horn signifikant mehr Implantationen aufweise als das linke.

Ein Vergleich zwischen den hier aufgeführten Ergebnissen und den von BARR et al. (1969, 1970a, 1970b) mitgeteilten Befunden ist in Tab. 12 zusammengestellt.
Eine negative Korrelation der Implantationszahl zwischen den korrespondierenden Uterushörnern wurde auch von HOLLANDER und STRANG (1950), RUNNER (1951), BOWMANN und ROBERTS (1958) und

Tabelle 11

Vergleich der beiden Uterushörner

	rechtes Horn	linkes Horn
Hornzahl	22	22
Implantionen	103	110
% Resorptionen	10,7 %	11,0 %
γDNA/Embryo	306,4 ± 46,4	322,6 ± 54,3
dpm DNA/ γDNA	37,6 ± 4,2	37,8 ± 3,7
dpm Lipide/ γDNA	70,1 ± 11,5	70,3 ± 13,4
Gesamtaktivität/γDNA	269,3 ± 46,7	268,5 ± 52,5

22 schwangere Ratten wurden am Tag 13 + 5 h - 5 Stunden nach der intravenösen Gabe von ^{14}C-Glukose (vgl. 2.3.) - der Schwangerschaft getötet. Ihre Feten wurden mit der unter 2.4.3.1. angegebenen Methode in verschiedene Zellkomponenten getrennt und die Radioaktivität , bezogen auf DNA, in den einzelnen Zellkomponenten bestimmt. In den verglichenen Parametern zeigt sich keine Heterogenität zwischen dem rechten und linken Horn ($P > 0,05$).

Tabelle 12

Vergleich unserer Ergebnisse mit den Angaben von BARR, JENSH und BRENT für Seitenunterschiede

	BARR et al.	EPPING
gleiche Anzahl von Implantationen rechts und links	8,2 %	15,9 %
Implantations-häufigkeit	re > li p < 0,02	re = li
Mittlere Differenz in der Implantationszahl zwischen den Hörnern	3,15	1,99
Größte Differenz in der Implantationszahl zwischen den Hörnern	10	7
"m" +)	- 0,36	- 0,517
Resorptionshäufigkeit	re = li	re = li
Mittleres Fetalgewicht	re = li	re = li
^{14}C-Inkorporation in einzelne Zellkomponenten	./.	re = li

+) m = bedeutet Steigung der Funktion, die in Abb. 19 definiert wurde.

BARR (1971) mitgeteilt. DANFORD und ABERLEY (1928) und McLAREN und MITCHIE (1956) fanden dagegen keine Korrelation zwischen der Implantationszahl in den beiden Uterushörnern. Sie konnten aber eine negative Korrelation im Eiausstoß zwischen den beiden Ovarien sichern. Diese negative Korrelation spiegelte sich jedoch nicht in der Implantationszahl wieder, da auf der Seite, auf der mehr corpora lutea vorlagen, auch ein größerer Präimplantations-Verlust auftrat.

Nach Gabe von Gonadotropinen wird eine positive Korrelation zwischen der Implantationszahl in den beiden Hörnern gefunden (McLAREN 1959a, 1959b). Die Dauer einer wirksamen FSH-Konzentration (NEUMANN 1970, MAHESH 1971) im Blut, die mit zunehmender Ovulationszahl verringert wird, begrenzt die Gesamtzahl an Ovulationen. Dieser Zeitraum kann durch Gabe dieses Hormons verlängert werden, wie es bei der Erzeugung einer "superpregnancy" geschieht (McLAREN 1959a, 1959b). Warum die Zahl der Ovulationen in einem Ovar zu einem bestimmten Zeitpunkt wahrscheinlicher ist als im anderen, bleibt ebenso ungeklärt wie die Frage, ob bei der Ratte in jedem Zyklus dasselbe Ovar mehr Ovulationen aufweist.

4.2.1. Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Implantationszahl im Tier

4.2.1.1. Resorptionsrate

Am Tag 13 sowie am Tag 20 besteht zwischen Muttertieren mit 8 und mit 11 Implantationen kein signifikanter Unterschied in der Resorptionsrate, d.h. in der Zahl der Resorptionen bezogen auf Implantationen (Tab. 13 und 14). Je höher die Implantationszahl pro Tier ist, desto häufiger finden sich im Muttertier Resorptionen (Tab. 13 und 14).

Für Tiere mit sehr hohen oder sehr niedrigen Implantationszahlen lassen sich aus den untersuchten Tieren keine Schlüsse ziehen;

Tabelle 13

Resorptionshäufigkeit am Tag 20 in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Tier

Implantationen/Tier	6	7	8	9	10	11	P für 7 11
Anzahl der Muttertiere	3	6	9	8	3	2	
Anzahl der Implantationen	18	42	72	72	30	33	
Resorptionen mittlere		3	4	3		2	P > 0,05
Resorptionen frühe				1	2		
Resorptionsrate	-	7,1 %	5,5 %	5,5 %	6,6 %	9,1 %	P > 0,05
Muttertiere mit Resorptionen	-	3	4	4	2	2	P > 0,05
% Muttertiere mit Resorptionen	-	50 %	44 %	50 %	67 %	100 %	P > 0,05
Mittleres Fetalgewicht	2,8 ± 0,3	3,0 ± 0,2	2,7 ± 0.4	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,4	2,8 ± 0,2	

Die Auswertung von 31 unbehandelten Ratten erfolgte am Tag 20. Die Prüfung auf Signifikanz wurde mit dem Student oder x^2-Test durchgeführt.

Tabelle 14

Resorptionshäufigkeit am Tag 13 in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Tier

Implantationen/Tier	8	9	10	11	P 8 11
Anzahl der Muttertiere	2	6	8	2	
Anzahl der Embryonen	16	54	80	22	
Resorptionen	1	6	10	3	
Resorptionsrate	6,3 %	11,1 %	12,5 %	13,6 %	P > 0,05
Muttertiere mit Resorptionen	1	4	7	2	
% Muttertiere mit Resorptionen	50 %	66,7 %	87 %	100 %	P = 0,02

Die Auswertung von 21 unbehandelten Muttertieren erfolgte am Tag 13. Jeweils ein Muttertier mit 2, 6 und 14 Implantationen wurde in die Aufstellung nicht aufgenommen wegen der mangelnden Aussagekraft. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem x^2-Test. Neben den angeführten Signifikanzberechnungen für Tiere mit 8 und 11 Implantationen wurden auch Tiere mit 8 Implantationen mit den restlichen verglichen. Eine Signifikanz ergab sich bei keiner der Berechnungen.

die Normalverteilung (Abb. 22) der Implantationszahl im Tier zeigt die relative Seltenheit solcher extremen Implantationszahlen. Auch bei einer wesentlich höheren (Faktor 10) Tierzahl wäre für Tiere mit sehr hohen (mehr als 14) und sehr niedrigen Implantationszahlen (weniger als 6) wahrscheinlich keine signifikante ($P < 0,01$) Aussage möglich. Die Zahl der untersuchten Tiere (Tab. 13 und 14) ist so klein, daß auch zwischen 6 % und 14 % keine Heterogenität zu sichern ist ($P > 0,05$). Auf die Untersuchung einer größeren Zahl von Tieren wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da sich aus den beiden untersuchten Tiergruppen auch kein Hinweis ($P < 0,05$) auf eine Abhängigkeit der Resorptionsrate von der Zahl der Implantationen ableiten läßt. Das häufigere Auftreten von Resorptionen in Tieren mit 11 Implantationen erklärt sich ausschließlich dadurch, daß der Prozentsatz von Resorptionen bezogen auf Implantationen zwischen Tieren mit 8 und Tieren mit 11 Implantationen gleich ist und somit Tiere mit höherer Implantationszahl bei gleicher Resoroptionsrate häufiger Resorptionen aufweisen müssen. In Bezug auf die Resorptionsrate müssen also Tiere mit unterschiedlicher Implantationszahl nicht als unterschiedliche Gruppen aufgefaßt werden. Diese Aussage ist allerdings nur in gewissen Grenzen statistisch zu sichern. Es empfiehlt sich daher, diese Grenzen für den bei teratologischen Experimenten verwendeten Tierstamm zu definieren. Für den von uns verwendeten Tierstamm Wistar SW 69 gehen wir so vor, daß Tiere mit Implantationen unter 6 und über 14 von der Auswertung ausgeschlossen werden. Eine zu anderen Tierstämmen vergleichbare Definition läßt sich anhand der Binominialverteilung der Implantationszahl pro Tier aufstellen, indem man Tiere, die innerhalb der doppelten Standardabweichung von der mittleren Implantationszahl liegen, als eine Gruppe erfaßt. Beiteratologischen Untersuchungen sollte die Zahl der somit eliminierten Tiere angegeben werden. Unerläßlich ist diese Forderung, wenn dem Muttertier Pharmaka vor der Implantation verabreicht wurden. Pharmaka, die die Implantation selbst beeinflussen, können den Prozentsatz an Tieren mit extremen Implantationszahlen verändern.

4.2.1.2. ^{14}C-Glukose-Einbau, DNA-Gehalt

Neben Untersuchungen über die Letalität in Abhängigkeit von der Implantationszahl im Tier wurden Wachstum und Syntheseleistung der Embryonen am Tag 13 untersucht mit den unter 2.4.3.1. angegebenen Methoden. Tab. 15 zeigt den Gehalt an DNA sowie die ^{14}C-Radioaktivität in den einzelnen Embryonen von Muttertieren mit unterschiedlicher Implantationszahl.

Auch diese Kriterien weisen auf keine Heterogenität zwischen Tieren mit 8 und mit 14 Implantationen hin.

4.2.1.3. Diskussion

Wie in der Einleitung referiert, fanden zahlreiche Untersucher an unterschiedlichen Spezies ein vermindertes fetales Feuchtgewicht am Termin mit zunehmender Implantationszahl. Das Ausmaß dieser Wachstumsverminderung ist zwischen den einzelnen Tierarten sehr verschieden. Es fällt auf, daß Tiere mit relativ langen Tragzeiten, d.h. Tiere, deren Feten bei der Geburt relativ reif sind wie z.B. das nestflüchtende Meerschweinchen, und Spezies, die relativ selten Mehrlinge austragen, wie z.B. der Mensch, eine stärkere Verminderung des fetalen Geburtsgewichtes in Abhängigkeit von der Zahl aufweisen. Ob in Tieren mit höheren Implantationszahlen die Wachstumsrate während der gesamten Schwangerschaftsdauer oder nur ab einem bestimmten Zeitpunkt verringert ist, kann eine Untersuchung des fetalen Geburtsgewichtes nicht zeigen.

Daß lange Tragzeiten eine stärkere implantationsabhängige Verminderung des fetalen Geburtsgewichtes zeigen, deutet darauf hin, daß gegen Ende der Schwangerschaft die Versorgung limitierend ist.

Unsere Untersuchungen zeigen weiter, daß die Ratte am Tag 13 in Wachstumsrate und Synthese-Leistung keine signifikante Abhängigkeit von der Implantationszahl aufweist. Da das Geburts-

gewicht der Ratte mit zunehmender Implantationszahl vermindert ist (BARR et al. 1969, 1970), muß man annehmen, daß sich eine hohe Implantationszahl pro Tier erst zwischen Tag 13 und dem Geburtstermin wachstumsvermindernd auswirkt.

4.2.2. Abhängigkeit des intrauterinen Wachstums von der Zahl der Implantationen im Horn

Seitdem ECKSTEIN (1955a, 1955b) darauf hinwies, daß möglicherweise unterschiedliche Mechanismen eine Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Tier und eine Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Horn bedingen könnten, ist es notwendig, beide gesondert zu untersuchen.

4.2.2.1. Resorptionsrate

Die Tab. 16 und 17 zeigen, daß keine signifikanten ($P > 0,05$) Unterschiede in der Resorptionshäufigkeit zwischen Hörnern mit unterschiedlicher Implantationszahl am Tag 13 und am Tag 20 bestehen. Wie schon in 4.2.1. diskutiert, ist diese Aussage nur innerhalb gewisser Grenzen zu sichern.

Da in Bezug auf die Resorptionsrate (Tab. 16 und 17) keine Heterogenität zwischen Hörnern mit 3 und mit 7 Implantationen statistisch zu sichern ist, können die Feten bzw. Embryonen aus diesen Hornern als einer Gruppe zugehörig betrachtet werden. Für die durch diese Festsetzung eliminierten Hörner gilt das schon unter 4.2.1.3.Gesagte.

4.2.2.2. ^{14}C-Glukose-Einbau

Wachstums- und Synthese-Rate, deren Parameter, Gehalt an DNA und ^{14}C-Aktivität in den einzelnen Fraktionen in Tab. 18 wiedergegeben sind, zeigen keine signifikanten ($P > 0,05$) Unterschiede zwischen Embryonen, die aus Hörnern mit 3 oder mit 7 Implantationen stammen.

Die Darstellung der Ergebnisse in Tab. 18 berücksichtigt nicht die Zahl der Implantationen im jeweils korrespondierenden Horn.

DNA-Gehalt und ^{14}C-Einbau in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Tier

Zahl der Implantationen pro Tier	γ DNA/Embryo	dpm / γ DNA						Zahl der schwangeren Ratten
		Gesamtaktivit.	Säurelöslich	Lipide	RNA	DNA	Protein	
8	278 ± 57	275 ± 30	71 ± 8	87 ± 8	56 ± 7	39 ± 2	74 ± 9	2
9	322 ± 46	274 ± 48	73 ± 19	84 ± 6	51 ± 9	39 ± 5	73 ± 7	6
10	297 ± 25	253 ± 51	68 ± 7	84 ± 10	47 ± 7	38 ± 5	65 ± 3	8
11 - 14	360 ± 80	275 ± 25	67 ± 7	79 ± 8	48 ± 3	38 ± 4	65 ± 5	3
P für 8 11, 14	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,02	0,03	> 0,05	o,02	

Gehalt an DNA des 13 Tage Embryos sowie ^{14}C-u-Glukose-in-vivo (5 h) Einbau in die einzelnen Fraktionen (vgl. 2.4.3.1.) werden in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Tier angegeben. P ist mit dem Student-Test errechnet worden.

Tabelle 15

Tabelle 16

Resorptionshäufigkeit am Tag 13 in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Uterushorn

Implantationen/ Horn	2	3	4	5	6	7
Anzahl der Hörner	2	5	11	8	10	5
Anzahl der Implantationen	4	15	44	40	60	35
Resorptionen	0	1	2	6	8	1
Resorptionsrate	0	6,6 %	4,5 %	15 %	13 %	2,9%

Die Auswertung erfolgte am Tag 13. Die Unterschiede in der Resorptionsrate zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht signifikant ($P > 0,05$, x^2 - Test).

Tabelle 17

Resorptionshäufigkeit am Tag 20 in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Uterushorn

Implantationen/ Horn	1	2	3	4	5	6	7
Anzahl der Hörner	3	10	6	17	13	9	4
Anzahl der Implant.	3	20	18	68	65	54	28
Resorptionen	0	0	1	4	4	3	2
Resorptionsrate	-	-	5,5 %	5,9 %	6,2 %	5,5 %	7,1 %

Die Auswertung erfolgte am Tag 20. Die Unterschiede in der Resorptionsrate zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht signifikant ($P > 0,05$, x^2-Test).

Tabelle 18

DNA-Gehalt und ^{14}C-Einbau in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Uterushorn

Implant./Horn	γDNA/Embryo	dpm/γDNA		
		Gesamtakt.	Lipide	DNA
3 n = 5	316 ± 44	259 ± 63	72 ± 12	38 ± 1
4 n = 11	294 ± 43	284 ± 47	74 ± 13	39 ± 4
5 n = 11	320 ± 49	254 ± 49	66 ± 13	37 ± 4
6 n = 10	313 ± 66	268 ± 55	69 ± 13	39 ± 4
7 n = 5	341 ± 52	286 ± 8	67 ± 15	38 ± 4

Gehalt an DNA des 13 Tage Embryos sowie ^{14}C-u-Glukose-in-vivo-Einbau (5 h) in die einzelnen Fraktionen (vgl. 2.4.3.1.) werden in Abhängigkeit von der Implantationszahl pro Uterushorn angegeben. P ist mit dem Student-Test errechnet worden, wobei alle Gruppen (3, 4, 5, 6, 7) in allen Parametern (Gesamtaktivität, Lipide, DNA) miteinander verglichen wurden. P war stets höher als 0,05!

Tabelle 19

Vergleich von Uterushörnern mit unterschiedlicher Implantationszahl

	Implantations-reicheres Horn n = 10	Implantations-ärmeres Horn n = 10
Gesamtaktivität	102,2 ± 3,2	98,0 ± 4,4
	P = 0,05	
^{14}C DNA	101,1 ± 3,7	99,4 ± 4,3
	P = 0,5	
γDNA	99,4 ± 6,8	100,7 ± 8,3
	P > 0,5	

Es wurden am Tag 13 der Schwangerschaft jeweils Hörner unterschiedlicher Implantationszahl verglichen. Die Differenz an Implantationen war mindestens 2, das implantationsreichere Horn wies z.B. 6 Embryonen und das implantationsärmere 4 oder 3 auf. Der Mittelwert für ein Horn wurde prozentual auf den Mittelwert von allen Embryonen des jeweiligen Tieres bezogen. Es wurde aus diesen Prozentwerten jeweils für die implantationsärmeren und implantationsreicheren Tiere ein Mittelwert gebildet, welche in der Tabelle wiedergegeben sind und deren Unterschiedlichkeit mit dem Student-Test geprüft wurde.

Ein solches Vorgehen ist nur zulässig, wenn die Zahl der Implantationen im korrespondierenden Horn das untersuchte Horn nicht beeinflußt. Die Zahl der Embryonen im korrespondierenden Horn summiert sich mit der Zahl der Embryonen im untersuchten Horn zur Gesamtzahl der Embryonen im Tier, von der am Tag 13 das Wachstum unabhängig ist (vgl. 4.2.1.); daher kann die Zahl der Embryonen im korrespondierenden Horn unberücksichtigt gelassen werden.

Eine weitere Möglichkeit, Beeinflussungen durch die Implantationszahl im Horn aufzuzeigen, ist durch den Vergleich von Hörnern gegeben, die im selben Muttertier liegen und eine unterschiedliche Implantationszahl aufweisen. Auch bei diesem Vergleich (vgl. Tab. 19) läßt sich keine signifikante Differenz sichern. Das Ergebnis dieses Vergleichs bestätigt also den Befund, daß am Tag 13 das embryonale Wachstum unabhängig von der Zahl der Implantationen in einem Horn ist. Wie auch für die Wachstumsabhängigkeit von der Implantationszahl im Tier muß man für die Wachstumsabhängigkeit von der Implantationszahl im Horn annehmen, daß sie sich erst zwischen Tag 13 und dem Geburtstermin ausprägt.

4.3. ABHÄNGIGKEIT DES INTRAUTERINEN WACHSTUMS VON RESORPTIONSVORGÄNGEN

Am Tag 13 können Resorptionen mit Placentaranlagen ("mittlere Resorption") von Resorptionen ohne erkennbare Placentaranlagen ("frühe Resorptionen") unterschieden werden. Um die Rückwirkung von Resorptionen auf die im Horn überlebenden Embryonen zu untersuchen, wurde folgendermaßen vorgegangen: für Hörner mit einer "mittleren Resorption", "frühen Resorption" und "ohne Resorption" wurde jeweils der Mittelwert (M) des Einbaus von ^{14}C in eine Fraktion gebildet. Dieser Mittelwert wurde als Prozent (x, y) vom Mittelwert des gegenüberliegenden Hornes ausgedrückt:

Tabelle 20

Rückwirkung von Resorptionen auf die überlebenden Embryonen

	Horn mit Resorption	Signifikanz gegenüber resorptionslosen Hörnern
Säure	115,5 ± 12,1	P = 0,02
Lipide	110,2 ± 10,0	P = 0,05
RNA	112,0 ± 7,5	P = 0,007
DNA	112,0 ± 5,9	P < 0,0027
Protein	109,4 ± 7,7	P = 0,02
Gesamtaktivität	107,8 ± 3,8	P < 0,0027

Es sind die prozentualen Veränderungen des ^{14}C-Einbaus in die einzelnen embryonalen Fraktionen in Hörnern mit Resorptionen gegenüber resorptionslosen Hörnern (jeweils 100 %) wiedergegeben. Die Berechnung (siehe Text) erfolgte unter Berücksichtigung der Zahl der Implantationen in den einzelnen Hörnern.

$$x = \frac{M_a \text{ (Horn mit Resortpion)}}{M_b \text{ (Horn ohne Resorption)}} \times 100$$

$$y = \frac{M_a \text{ (Horn ohne Resorption)}}{M_b \text{ (Horn ohne Resorption)}} \times 100$$

a und b bedeuten eine jeweils festgesetzte Zahl von Implantationen im Horn.

Um eine - auch statistisch nicht signifikante - Abhängigkeit von der Implantationszahl im Tier und im Horn auszuschließen, wurden nur Hörner mit gleichartiger Implantationsverteilung verglichen (z.B. rechts 4, links 6), welches durch die Bildung des Quotienten geschah:

$$c = \frac{X}{y} \times 100$$

Die Werte für c sind in Tab. 20 wiedergegeben.

"Frühe Resortionen" verändern nicht den Einbau von ^{14}C in die säurelösliche Fraktion, in Lipide, RNA, DNA und Proteine sowie den Gehalt an DNA. Mittlere Resorptionen (Tab. 20) erhöhen den ^{14}C-Einbau in die DNA und in die Summe aller Fraktionen signifikant. Diese Erhöhung des Einbaues beträgt für Hörner mit einer Resorption in den einzelnen Fraktionen zwischen 8 und 15 %!

Um die Wirkung von Resorptionen auf die benachbarten, überlebenden Embryonen zu zeigen, wurde der jeweilige Wert des benachbarten Embryos als Quotient vom Mittelwert des die Resorption aufweisenden Horns ausgedrückt:

$$\frac{E \text{ (resorptionsbenachbart)}}{M \text{ (Horn mit Resorption)}} \times 100$$

Resorptionsbenachbarte Embryonen wiesen in der DNA-Fraktion 98 % $\pm$ 5,3 (n = 9) des ^{14}C-Einbaues auf, den die übrigen überlebenden Embryonen desselben Hornes zeigten (100 % $\pm$ 10; n = 36). Dieser

Unterschied ist nicht signifikant (P > 0,5). Die Gesamtaktivität war mit 102 % ± 5,4 bei den resorptionsbenachbarten Embryonen gegenüber den restlichen Embryonen (100 % ± 17; n = 36) auch nicht signifikant (P > 0,5) verändert.

Der Einbau in die einzelnen Fraktionen von Embryonen, die Resorptionen umgeben, zeigt also keinen signifikanten Unterschied gegenüber den anderen im Horn verbleibenden Embryonen. Es gibt also keine positionsspezifische Wirkung von Resorptionen, sondern die Resorption wirkt sich gleichermaßen aus auf alle im Horn überlebenden Embryonen am Tag 13.

Wenn es zu einer Resorption vor der Placentation kam, findet sich keine Nachwirkung dieser Resorption auf den Embryo am Tag 13. Man kann also Embryonen aus Hörnern mit einer frühen Resorption und ohne Resorption in einer Gruppe zusammenfassen, wenn man die Embryonen am Tag 13 oder später untersuchen will. Wird ein Embryo während und nach der Placentation resorbiert - also nach Tag 11 - so sind alle im Horn verbleibenden Embryonen im gleichen Maße bevorteilt gegenüber Embryonen aus Hörnern ohne Resorption. Die intrauterine Ernährung, welche durch die uterine Blutversorgung garantiert und durch das Gefäßwachstum reguliert wird, scheint sich also bis zum Tag 13 der Implantationszahl so genau anzupassen, daß erstens die Zahl der Implantationen im Muttertier und im Horn für den einzelnen Embryo keine Rolle spielt und zweitens beim Verlust eines Embryos durch Resorption die anderen zeitweise überschüssig versorgt werden (8 %).

4.4. ABHÄNGIGKEIT DER INTRAUTERINEN ENTWICKLUNG VOM IMPLANTATIONSORT

4.4.1. Untersuchungen am Tag 13

Einen weiteren Einblick in die Beeinflussung des intrauterinen Wachstums gewinnt man, wenn man die Embryonen bzw. Feten gemäß ihrer intrauterinen Position untersucht. Tab. 21 gibt den ^{14}C-Einbau in die Lipid- und DNA-Fraktion sowie in den gesamten Embryo und den embryonalen DNA-Gehalt wieder - aufgeschlüsselt

Wachstumsabhängigkeit vom Implantationsort am Tag 13 der Schwangerschaft

	C_1 n = 35	C_2 n = 21	m n = 49	O_2 n = 21	O_1 n = 35	P für C_1 M; M O_1
% γDNA	105 ± 14	104 ± 17	101 ± 13	104 ± 13	97 ± 21	0,05
% Gesamtakt./γDNA	99 ± 7	99 ± 5	99 ± 4	98 ± 11	101 ± 7	0,05
% dpm Lipid/γDNA	99 ± 7	100 ± 6	99 ± 7	103 ± 5	100 ± 8	0,05
% dpm DNA/γDNA	98 ± 5	98 ± 6	101 ± 8	102 ± 6	101 ± 8	0,05
γDNA/Embryo	335 ± 46	335 ± 83	311 ± 48	326 ± 77	303 ± 76	0,05
Gesamtakt./γDNA	240 ± 46	248 ± 48	247 ± 50	235 ± 45	248 ± 37	0,05
Lipid dpm/γDNA	63 ± 11	66 ± 12	64 ± 12	66 ± 10	67 ± 11	0,05
DNA dpm/γDNA	37 ± 5	37 ± 5	39 ± 4	38 ± 5	38 ± 5	0,05

Definition der Positionen (C_1, C_2, M, O_2, O_1) siehe 2.8. Der untere Teil der Tabelle gibt die Meßwerte für den embryonalen DNA-Gehalt und den ^{14}C-Einbau wieder; der obere Teil gibt diese W rte in Prozent vom Mittelwert im Horn an.

Tabelle 21

nach intrauterinen Positionen. Um den "Litter-Effekt und die Auswirkungen unterschiedlicher Embryonenzahl auszuschließen, wurden alle Werte auch als Prozent vom Mittelwert im jeweiligen Horn ausgedrückt. Die Embryonen verschiedener Positionen zeigen am Tag 13 in keinem der untersuchten Kriterien Unterschiede.

4.4.2. Untersuchungen am Tag 20

Bei der Ratte fanden BARR und Mitarbeiter (1969) eine Abhängigkeit des fetalen Feuchtgewichtes am Termin von der Position. Um Stammesunterschiede auszuschließen, führten wir diese Untersuchungen auch an unserem Rattenstamm durch.

Diese Untersuchung wurde durchgeführt an einer Gruppe von 34 unbehandelten Muttertieren. In die Untersuchung wurden nur Hörner mit mindestens 3 Implantationen und höchstens 1 Resorption einbezogen. Es verbleiben somit 50 Hörner.

Mittlere placentare und fetale Gewichte sind in Tab. 22 aufgeführt.

Um die Variation im Gewicht zwischen verschiedenen Würfen auszuschließen, für die das Alter und das Gewicht des Muttertieres, genetische Faktoren, Zeitpunkt der Konzeption und Zeitpunkt der Entbindung ausschlaggebend sind, wurde die statistische Analyse auf zwei Wegen angestellt:

1) Um einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen von BARR und Mitarbeitern (1969) zu haben, wurde der von ihnen angewendete Quotient gebildet (vgl. Tab.24).

$$\frac{\text{mittleres Fetalgewicht - individuelles Fetalgewicht}}{\text{Standardabweichung}}$$

2) Wie auch in den übrigen Darstellungen dieser Arbeit wurde das individuelle Fetalgewicht in Prozent vom mittleren Fetalgewicht des jeweiligen Uterushornes ausgedrückt (Abb. 24).

Fetales und placentares Gewicht in Abhängigkeit vom Implantationsort

		C_1	C_2	M	O_2	O_1
Fetalgewicht	Hörner mit 3 Implant. n = 6	2,73 ± 0,40		2,80 ± 0,40		2,67 ± 0,36
	Hörner mit 4 Implant. n = 16	2,73 ± 0,40	2,76 ± 0,4		2,74 ± 0,35	2,67 ± 0,36
	Hörner mit mind. 5 Implantationen n = 28	2,90 ± 0,32	2,90 ± 0,34	2,96 ± 0,31	2,86 ± 0,27	2,86 ± 0,25
Placentage-wicht	Hörner mit 3 Implant. n = 6	0,50 ± 0,1	-	0,59 ± 0,08	-	0,51 ± 0,07
	Hörner mit 4 Implant. n = 16	0,50 ± 0,1	0,50 ± 0,09	-	0,49 ± 0,07	0,51 ± 0,07
	Hörner mit mind. 5 Implantationen n = 28	0,52 ± 0,09	0,51 ± 0,07	0,52 ± 0,09	0,52 ± 0,08	0,53 ± 0,09

Definition der Positionen (C_1, C_2, M, O_2, O_1) siehe 2.8. 34 Muttertiere wurden am Tag 20 der Schwangerschaft durch Kaiserschnitt entbunden und Feten und Placenten gewogen. In der Aufstellung werden die Uterushörner mit 3, 4, und mindestens 5 Feten getrennt aufgeführt. Mit Hilfe des Student-Tests ließ sich für die Heterogenität der fetalen Gewichte zwischen M und O_1 eine Wahrscheinlichkeit von P = 0,02 ermitteln.

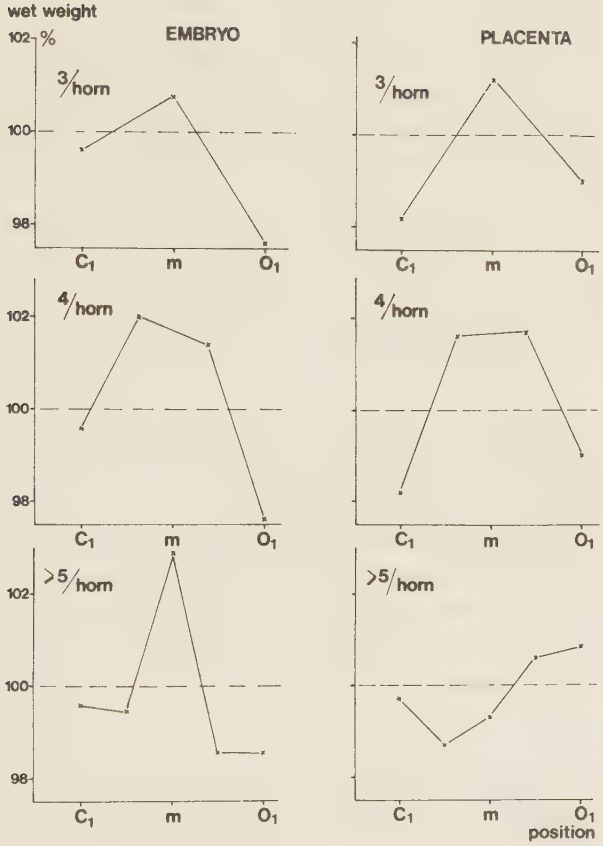

Abbildung 24

Fetales und placentares Gewicht in Abhängigkeit vom Implantationsort

Definition der Positionen (C_1, C_2, M, O_2, O_1) siehe 2.8. Die in Tab. 22 angegebenen Daten sind hier jeweils als Prozent vom Mittelwert des betreffenden Horns angegeben. Die Standardabweichung beträgt 5 - 7 %.

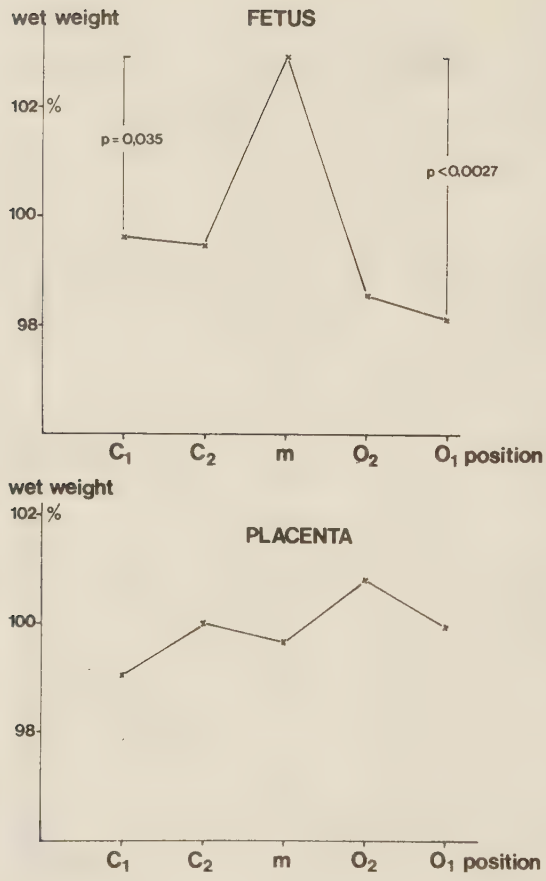

Abbildung 25

Fetales und placentares Gewicht in Abhängigkeit vom Implantationsort

Definition der Positionen (C_1, C_2, M, O_2, O_1) siehe 2.8. Die in Abb. 22 nach der Implantationszahl im Horn aufgeschlüsselten Angaben sind hier zusammengefaßt. Die Standardabweichung beträgt 5 - 7 %.

$$\frac{\text{individuelles Fetalgewicht}}{\text{mittleres Fetalgewicht}} \times 100$$

Die mit dem zweiten Verfahren erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 24 graphisch dargestellt, wobei Hörner mit 3, 4 und mindestens 5 Implantationen im Horn einzeln aufgeführt sind; Abb. 25 faß diese Hörner zusammen. Die mit Hilfe des "student test" errechneten P-Werte sind in der graphischen Darstellung ebenfalls angeführt. Die mittleren Fetalgewichte zwischen Position M und O_1 unterscheiden sich mit einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0{,}0027$ und zwischen M und C_1 mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0{,}04$. Für die Placentagewichte ergeben sich in dieser Darstellungsform keine signifikanten Unterschiede ($P > 0{,}05$).

Ein Vergleich mit den Ergebnissen von BARR und Mitarbeitern (1970b) ist in Tab. 23 und 24 zusammengestellt. Das mittlere Fetalgewicht in der Position M ist in beiden Untersuchungen mit annähernd der gleichen Wahrscheinlichkeit höher als in den Positionen O_1 und C_1. Auffallend in den hier dargestellten Untersuchungen ist, daß im Gegensatz zum mittleren Fetalgewicht das mittlere Placentagewicht keine Bevorzugung in der Position M erfährt.

4.4.3. Diskussion

Wie schon für die Abhängigkeit des pränatalen Wachstums von der Implantationszahl im Horn sowie der Implantationszahl im Tier ließ sich auch die Abhängigkeit von der intrauterinen Position, welche am Tag 20 signifikant ist, am Tag 13 nicht nachweisen. Die aufgeführten Abhängigkeiten des pränatalen Wachstums entwickeln sich also erst zwischen Tag 13 und dem Geburtstermin.

Für die von McLAREN und MICHIE (1960, 1963) bei der Maus und von BARR und Mitarbeitern (1969, 1970b) bei der Ratte gefundenen Positionsunterschiede wurden vier Aspekte diskutiert:

1) Myometrialer Druck
   Die Uterusmuskulatur könnte entlang eines Hornes einen

Literaturvergleich: Geburtsgewicht in ausgewählten intrauterinen Positionen

Implantationen/Horn		C_1 +	C_2	M	O_2	O_1
3	Barr ++	5,05 ± 0,52	-	5,34 ± 0,42	-	4,98 ± 0,62
	Epping	2,73 ± 0,40	-	2,80 ± 0,40	-	2,67 ± 0,36
4	Barr	4,99 ± 0,61	5,20 ± 0,55		5,19 ± 0,53	4,97 ± 0,57
	Epping	2,73 ± 0,40	2,76 ± 0,4	-	2,74 ± 0,35	2,67 ± 0,3-
5	Barr	4,90 ± 0,43	4,97 ± 0,43	5,09 ± 0,56	5,00 ± 0,59	4,92 ± 0,58
	Epping	2,90 ± 0,32	2,90 ± 0,34	2,96 ± 0,31	2,86 ± 0,27	2,86 ± 0,25

+ Definition der Positionen siehe 2.8.

++ Barr M., Jensh R.P. und Brent (1970b)

Tabelle 23

Tabelle 24

Literaturvergleich: Abhängigkeit des fetalen Wachstums vom Implantationsort

Impl./Horn	Autor	C_1 +	C_2	M	O_2	O_1
3	Barr ++	- 0,30		+ 0,70		- 0,48
	Epping	- 0,15		+ 0,38		- 0,35
4	Barr	- 0,32	+ 0,35		+ 0,35	- 0,40
	Epping	- 0,15	+ 0,16		+ 0,34	- 0,35
5	Barr	- 0,30	- 0,15	+ 0,40	+ 0,05	- 0,17
	Epping	- 0,10	- 0,15	+ 0,26	- 0,19	- 0,16

+ Definition der Positionen siehe 2.8.

++ Barr M, Jensh R.P. und Brent (1970b)

Um die biologische Streuung zwischen Muttertieren auszuschließen, wurde der von BARR et al. (1969) angegebene Quotient gebildet.

$$\frac{\text{Individualgewicht - mittlerem Fetalgewicht des Hornes}}{\text{Standardabweichung aller Hörner}}$$

Die Wahrscheinlichkeit für ein unterschiedliches Gewicht in den einzelnen Positionen ist in den verglichenen Untersuchungen gleich groß (O_1, $C_1 < M$; $P = 0,01$).

unterschiedlichen Druck auf die in ihre Schleimhaut implantierten Embryonalanlagen ausüben. Die Störungen in der Embryonalentwicklung bei intraamnialer Volumengabe (DOSTAL 1969) wurden z.T. auf die volumenbedingte intraamniale Druckerhöhung zurückgeführt. Ebenso wie der intraamniale Druck könnte der myometriale einen Einfluß auf die Embryonalentwicklung haben. Messungen des myometrialen Druckes sowie des intraamnialen Druckes unter Berücksichtigung des fetalen Wachstums sind uns nicht bekannt. BARR und Mitarbeiter (1969) teilten mit, daß sie keine Beeinflussung des intrauterinen Wachstums beobachten konnten, nachdem sie eine myometriale Druckerhöhung durch extramyometriale Druckausübung imitierten.

2) Unterschiede im Uterusgewebe
Für die Positionsabhängigkeit könnte man quantitative Unterschiede im Uterusgewebe selbst verantwortlich machen. Diese Spekulation erhärtenden Experimente sind uns für den Uterus des Nagers nicht bekannt.

3) Die Zeit der Implanation
MOSSMANN (1937) zeigte an der Maus, daß ovariell die Implantation früher stattfindet und es somit zu intrauterinen Altersunterschieden käme. NOYES beobachtete ein höheres Geburtsgewicht nach verzögerter Implantation. Wenn die Positionsabhängigkeit bedingt wäre durch die Zeit der Implantation, müßten solche Altersunterschiede in der gesamten Postimplantationsperiode vorhanden sein. Der embryonale DNA-Gehalt ist ein sicheres und in der Phase des schnellen Wachstums ein empfindliches Maß für das Alter. Am Tag 13 konnten wir keine positionsabhängigen Unterschiede im embryonalen DNA-Gehalt finden.

4) Blutversorgung
ECKSTEIN (1955) unterstellte, daß jeder Placentaranschluß hämodynamisch wie eine arteriovenöse Anasthomose wirke; BURWELL (1938)zeigte die hämodynamisch gleiche Wirkung von

arteriovenöser Fistel und Placentation. Aufgrund der arteriovenösen Anastomosen würde mit zunehmenden Abstand vom Ursprung der Arteria ovarica und der Arteria uterina der arterielle Blutdruck sinken, das Nährstoffangebot vermindert sein und damit die mittleren Positionen benachteiligt werden. MOLL und KÜNZEL (1971) maßen den Blutdruck in der Arteria uterina, Arteria ovarica sowie in der Arcade beim Meerschweinchen am Termin. Ihre Messungen bestätigten die Annahme, daß mit zunehmendem Abstand von den versorgenden Arterien der Blutdruck sinkt. Demgemäß fanden McLAREN und MICHIE (1960) bei der superprägnanten Maus auch eine Verminderung des Geburtsgewichts in der Position M. Das höhere fetale Geburtsgewicht bei der Ratte in der Position M (BARR und BRENT) schien diese Annahme zu widerlegen. Die Ligationsversuche ließen ein Gefälle entlang der alleinversorgenden Arterie im fetalen Wachstum beobachten. Solange zwei Arterien die den Uterus versorgenden Arcade bilden, muß sich dieses Gefälle in den mittleren Positionen nicht negativ auswirken, da die Summe der Zuflüsse in den mittleren Positionen gleich, größer oder kleiner sein kann als in den Positionen O_1 und C_1. Ob die Position M bevorzugt oder benachteiligt ist, hängt von der Zahl der Embryonalanlagen ab, die das Versorgungsgefälle bedingen. Hiermit würde man die Benachteiligung der mittleren Position in den implantationsreicheren Hörnern der von McLAREN (1960) verwendeten superprägnanten Mäuse erklären sowie die Bevorzugung der mittleren Position bei der absolut und relativ implantationsärmeren Ratte. Die später sich ausprägende Positionsabhängigkeit - zwischen Tag 13 und 20 - findet hiermit ebenso eine Erklärung, da für diese "hämodynamische Erklärung" der Placentaranschluß sowie die limitierte Blutversorgung vorausgesetzt werden muß.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird eine Übersicht über die uterinen Faktoren bei verschiedenen Spezies gegeben, die das pränatale Wachstum beeinflussen.

2. Verschiedene biochemische Screening Methoden, welche es ermöglichen, die Stoffwechselaktivität in einzelnen embryonalen und placentaren Zellkomponenten zu untersuchen, werden miteinander verglichen.

3. Eine Pentobarbitalanästhesie am Tag 11 der Schwangerschaft führt bei Ratten zu einer fetalen Wachstumsverzögerung bis zum Tag 13. Bis zum Tag 16 wird diese fetale Wachstumsverzögerung durch beschleunigtes Wachstum wieder ausgeglichen. Das Wachstum der Placenta zeigt keine Beeinflussung. Durch teratologische Untersuchungen des Feten am Geburtstermin können Veränderungen der Wachstumskinetik unter embryotoxischen Einflüssen nicht ermittelt werden.

4. Der ^{14}C-Glukose Einbau in embryonale und placentare Zellkomponenten wurde zwischen Tag 12 und 16 der Schwangerschaft bei der Ratte untersucht.

5. Die Abhängigkeit des fetalen und placentaren Wachstums von der Blutversorgung wurde untersucht. Am Tag 11 der Schwangerschaft wurde die Arteria uterina operativ unterbunden, so daß der Uterus danach nur noch von der Arteria ovarica versorgt wird. Die Auswirkungen der Ligatur wurden untersucht, indem die Resorptionsrate am Tag 12, 13, 16 und 20 sowie die uterinen Positionen der Resorptionen ermittelt wurden und indem der Einbau von ^{14}C-Glukose in verschiedene embryonale und placentare Zellkomponenten wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide gemessen wurde. 5 Std. vor der Kaiserschnittentbindung erhielten die Muttertiere intravenös 1 mCi/kg ^{14}C- -Glukose.

   a) Die Zahl der Resorptionen steigt zwischen Tag 12 und 16 an.

b) Die cervixnächsten Feten sterben zuerst ab. Sukzessiv folgen die jeweils ligationsnächsten Feten bis zum Tag 16, an dem ungefähr die Hälfte aller Feten des unterbundenen Hornes abgestorben sind. In der ovarnahen Hälfte des Uterushornes überleben die Feten. Diese zeigen zum Geburtstermin keine wesentliche Retardierung.

c) Vor dem Absterben zeigen die Feten eine Retardierung, welche sich in einem verminderten ^{14}C-Einbau in die Nukleinsäuren ankündigt und danach ihren Ausdruck findet in einem niedrigeren DNA-Gehalt, einem geringeren Feuchtgewicht und einer verminderten ^{14}C-Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion sowie in den Proteinen und Lipiden. Vor dem Absterben zeigt sich in der embryonalen Feinstruktur eine intramitochondriale Schwellung, eine Verminderung der Zahl der freien Ribosomen und ein Kontinuitätsverlust der Zellmembran.

d) Wenn der Fet schon deutlich retardiert ist, zeigt die dazugehörende Placenta noch keine Wachstumsbeeinflussung im ^{14}C-Einbau in die Nukleinsäuren, im DNA-Gehalt und in der Feinstruktur. Die erhöhte Aufnahme von ^{14}C-Glukose durch die Placenta könnte eine kompensatorisch gesteigerte Glykolyseaktivität wiederspiegeln. Das Feuchtgeswicht der Placenten, die lebende Feten am Geburtstermin versorgen, ist unbeeinflußt.

e) Am Tag 12 - d.h. 24 Std. nach der Ligation - bedingt die die Blutversorgung allein durch die Arteria ovarica keine Begrenzung für das embryonale und placentare Wachstum. Dieser Befund wird im Zusammenhang mit bekannten Stoffwechselunterschieden in der Embryonalentwicklung diskutiert.

f) Die sukzessive, positionsabhängige Beeinflussung des fetalen und placentaren Wachstums zeigt einerseits die zunehmende Abhängigkeit von der Blutversorgung im Laufe der Schwangerschaft und andererseits ein Versorgungsgefälle

entlang der - nach der Ligation allein versorgenden - Arteria ovarica.

6. Die Abhängigkeit des fetalen Wachstums von uterinen Faktoren wurde am Tag 13 und Tag 20 der Schwangerschaft untersucht. Am Tag 13 dienten als Kriterien neben dem DNA-Gehalt der ^{14}C-Einbau in verschiedene Zellkomponenten wie Lipide, RNA, DNA, Proteine und eine säurelösliche Fraktion. Am Tag 20 wurde das fetale und placentare Feuchtgewicht gemessen.

   a) Weder am Tag 13 noch am Tag 20 konnte unterschiedliches fetales Wachstum in den beiden Uterushörnern festgestellt werden. Zwischen den beiden Uterushörnern in einem Muttertier besteht eine negative Korrelation in der Zahl der Implantationen pro Horn.

   b) Im Gegensatz zu Untersuchungen am Tag 20 konnte am Tag 13 keine Abhängigkeit des fetalen Wachstums von der Zahl der Implantationen in einem Tier oder in einem Uterushorn festgestellt werden.

   c) Resorptionen, die vor Tag 11 der Schwangerschaft stattfanden, beeinflussen nicht das fetale Wachstum am Tag 13. Resorptionsvorgänge am Tag 11 und 12 der Schwangerschaft erhöhen die ^{14}C-Aufnahme durch den Embryo am Tag 13 um ungefähr 8 %.

   d) Am Tag 20 der Schwangerschaft weisen die Feten, die in der Mitte zwischen Ovar und Cervix implantiert hatten, ein um 4 % höheres Geburtsgewicht auf. Das Placentagewicht zeigt keine signifikanten Unterschiede. Am Tag 13 konnte keine positionsabhängige Beeinflussung des fetalen Stoffwechsels und Wachstums beobachtet werden.

   e) Die Abhängigkeit des fetalen Wachstums von der Zahl der Implantationen pro Tier und pro Horn sowie vom Implantationsort bildet sich erst zwischen Tag 13 und Tag 20 der

Schwangerschaft aus. Dieser Befund wird unter Berücksichtigung der Blutversorgung diskutiert.

f) Die Abhängigkeit oder Unabhängigkeit des fetalen Wachstums von der Zahl der Implantationen pro Tier und pro Horn ist nur innerhalb gewisser Grenzen zu sichern. Es erscheint uns daher angeraten, bei teratologischen Experimenten eine Auswahl von Tieren festzusetzen: Muttertiere bzw. Uterushörner mit einer extrem hohen oder extrem niedrigen Zahl an Implantationen sollten bei teratologischen Untersuchungen nicht berücksichtigt werden. Wenn Pharmaka vor der Implantation verabreicht werden, muß die Zahl der Tiere in der ausgesonderten Gruppe angegeben und ein möglicher Präimplantationsverlust berücksichtigt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, N.A., LYON, R.A.: Causes of prematurity: A review of the literature. Amer.J.Dis.Child. 58, 586-594 (1939)

BALLARD, F.J., HANSON, R.W.: Changes in lipid synthesis in rat liver during development. Biochem.J. 102, 952-958 (1967)

BARCROFT, J., HERKEL, W., HILL, S.: The rate of blood flow and gaseous metabolism of the uterus during pregnancy. J.Physiol. 77, 194-206 (1933)

- , KENNEDY, T.G.: J.Physiol. 95, 173 (1939)

- : Proc.Nutr.Soc. 2, 14 (1944). Zit. nach BARCROFT. Researches on prenatal life. Vol. 1, Blackwell Scientific Publication, Oxford.

BARR, M.J.R., JENSH, R.P., BRENT, R.L.: Fetal weight and intrauterine position in rats. Teratology 2, 241-246 (1969)

- : The roles of fetal sex, intrauterine position, and placental weight as determinants of fetal weight and water content in rats. Teratology 3, 197 (1970a)

- , BRENT, R.L.: The relation of the uterine vasculature to fetal growth and the intrauterine position effect in rats. Teratology 3, 251-260 (1970b)

- , JENSH, R.P., BRENT, R.L.: Prenatal growth in the albino rat: Effects of number, intrauterine position and resorptions. Am.J.Anat. 128, 413-428 (1970c)

- : The role of the time allowed for mating on variability of fetal weight in rats. Teratology 4, 1-6 (1971)

BASS, R., WIEDEMANN, G.: Studies on messenger-depleted ribosomal preparations from mammalian embryonic tissues. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 272, 234-238 (1972)

- : Respiration and oxidative phosphorylation of mitochondrial fractions isolated from rat embryos. Symposium on "Metabolic Pathways in Mammalian Embryos during Organogenesis and its Modification by Drugs", Berlin 1970

BECK, S.L.: Effects of position in the uterus on fetal mortality and on response to trypan blue. J.Embryol.Exp.Morph. 17, 617-624 (1967)

BERG, B.J. van den, YERUSHALMY, J.: The relationship of the rate of intrauterine growth of infants of low birth weight to mortality, morbidity and congenital anomalies. J.Pediat. 69, 531 (1966)

BOWMAN, J.C., ROBERTS, R.C.: Embryonic mortality in relation to ovulation rate in the house mouse. J.Exp.Biol. 35, 138 (1958)

BRENT, R.L., FRANKLIN, J.B.: Uterine vascular clamping: New procedure for the study of congenital malformations. Science 132, 89-90 (1960)

- : Uterine vascular clamping and other surgical techniques in experimental mammalian embryology. In: Teratology Principles and Techniques, edited by James G. Wilson and Josef Warkany (1964)

- , JENSH, R.P.: Intrauterine growth retardation. In: Advances in Teratology II, ed. Woollam, D.H.M., 1967 Logos Press, Academic Press

Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem.J. 62, 315-323 (1956)

BURWELL, S.C.: Placenta as modified arteriovenous fistula considered in relation to circulatory adjustments to pregnancy. Amer.J. med.Sci. 195, 1-7 (1938)

CARMICHAEL, J.: Bull. Ill. Agric.Exp.Sta. 226, 1920. Zit. nach Ibsen 1928

CHURCHILL, J.A.: The relationship between intelligence and birth weight in twins. Neurology 15, 341-347 (1965)

COTTER, J., BLECHNER, J.N., PRYSTOWSKY, H.: Blood flow and oxygen consumption of pregnant goats. Am.J.Obstet.Gynecol. 103, 1098-1101 (1969)

- , - , - : Oxygen, carbon dioxide, and hydrogen ion concentration in arterial and uterine venous blood of pregnant goats. Am.J. Obstet.Gynecol. 103, 1102 (1969)

- , - , -: Blood flow and gaseous metabolism of the rabbit uterus during pregnancy. Am.J.Obstet.Gynecol. 107, 411-416 (1970)

CURLEY, F.J., INGALLS, T.H.: Hypoxia at normal atmospheric pressure as a cause of congenital malformations in mice. Proc.Soc.Exptl. Biol.Med. 94, 87 (1957)

DAISER, N.: Arch. Gynaek. 169, 754 (1939)

DANFORTH, C.H., ABERLE, S.B.: The functional interrelation of the ovaries as indicated by the distribution of foetuses in mouse uteri. Amer.J.Anat. 41, 65 (1928)

DAVID, H.: Submikroskopische Ortho- und Pathomorphologie der Leber. Akademie-Verlag, Berlin 1964

DAWSON, B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin red S. Stain Technol. 1, 123 (1926)

De PLAEN, J.L.: Aspects dynamiques du métabolisme glucidique chez l'embryon de rat. Action de substances hypoglycémiantes et tératogènes. Collection "Médico-Monographies d'Agréges". Brüssel 1970

DISCHE, Z.: In: The nucleic acids, ed. by Chargaff, E. and Davidson, J.N., New York: Academic Press Inc.(1955)

DONALD, H.P., PURSER, A.F.: Competition in utero between twin lambs. J.Agr.Sci. 43, 245 (1956)

DOSTAL, M.: Morphogenesis of cleft palate induced by exogenous factors. Teratology 4, 63-68 (1971)

ECKSTEIN, P., MacKEOWN, Th.: Effect of transection of one horn of the guinea-pig's uterus on foetal growth in the other horn. J.Endocrin. 12, 97-107 (1955a)

- , - , RECORD, R.G.: Variation in placental weight according to litter size in the guinea-pig. J.Endocrin. 12, 108-114 (1955b)

FAIN, J.N., SCOW, R.O.: Fatty acid synthesis in vivo in maternal and fetal tissues in the rat. Amer.J.Physiol. 210, 19 (1966)

FALCONER, D.S., EDWARDS, R.G., FOWLER, R.E., ROBERTS, R.C.: Analysis of differences in the numbers of eggs shed by the two ovaries of mice during natural estrus or after super-ovulation. J.Reprod.Fertil. 2, 418-437 (1961)

- , ROBERTS, R.C.: Effect of inbreeding on ovulation rate and foetal mortality in mice. Genet. Research 1, 422-430 (1958)

- : The genetics of litter size in mice. J. Cell and Compar. Physiol. 56, 153 (1960)

FEILD, L.E., KRESHOVER, S.J., LIEBERMANN, J.E.: Temporary uterine circulatory arrest as a cause of abnormal fetal development. J.Dent.Res. 39, 1240-1247 (1960)

FLEXNER, L.B., ROBERTS, R.B.: The measurement of placental permeability with radioactive sodium. Am.J.Physiol. 128, 154-158 (1939)

FRANKLIN, J.B., BRENT, R.L.: Interruption of uterine blood flow: A new technique for the production of congenital malformations. Comparison of the eigth, ninth, and tenth days of gestation. Obstetrics and Gynecology 11, 415 (1960)

- , - : The effect of uterine vascular clamping on the development of rat embryos three to fourteen days old. J.Morph. 115, 273-286 (1964)

FRIEDMAN, E.A., SACHTLEBEN, M.R.: Placental oxygen consumption in vitro. J. Obstet.Gynec. 79, 1058 (1960)

- , KASS, M.B., SACHTLEBEN, M.R., JOHN, E.M.St.: Placental oxygen consumption in vitro. Am.J.Obstet.Gynecol. 107, 1 (1970)

FURNER, R.L., NEVILLE, E.D., TALARICO, K.S., FELLER, D.D.: Effects of pentobarbital on plasma glucose and free fatty acids in the rat. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 139, 231-234 (1972)

GIBSON, J.R., McKEOWN, T.: Observation on all birth (23970) in Birmingham 1947. III Survival. Brit.J.Prev.Soc.Med. 5, 177-183 (1951)

GOLDHOR, S.: Protein: Lipid ratios of liver mitochondria during development. J.Cell Biol. 37, 823-825 (1968)

GRABOWSKI, C.T.: The etiology of hypoxia-induced malformations in the chick embryo. J.exp.Zool. 157, 307-326 (1964)

GRUENWALD, P.: Abnormalities of placental vascularity in relation to intrauterine deprivation and retardation of fetal growth; significance of avascular chorionic villi. New York State J.Med. 61, 1, 508-513 (1961)

GUTTMACHER, N.: Amer.J.Obstet.Gynec. 38, 277 (1939)

HALD, N., SINKBAEK, N.: χ^2 - Test. Skand. Aktuar Tidskr. 33, 168 (150), zitiert nach Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage (1968)

HAMMOND, J.: Growth and development of mutton qualities in the sheep. p. 36. Edinburgh and London, Oliver and Boyd 1932

- : The fertilization of rabbit ova in relation to time. A method of controlling the litter size, the duration of pregnancy and the weight of the young at birth. J.Exp.Biol. 11, 140 (1934)

HASHIMA, H.: Studies on the prenatal growth of the mouse with special reference to the site of implantation of the embryo. Tohoku J. Agric. Res. 6, 307 (1956)

- : Studies on the prenatal growth of the mouse with special reference to the site of implantation of the embryo. J. Agricultural Research 6, 307 (1956)

HEALY, M.J.R., McLAREN, A., MICHIE, D.: Foetal growth in the mouse. Proc. Roy. Soc. London 153, 367-379 (1961)

HOHENAUER, L., OH, W.: Body composition in experimental intrauterine growth retardation in the rat. J. Nutrition 99, 23-26 (1969)

HOLLANDER, W.F., STRONG, L.C.: Intrauterine mortality and placental fusions in the mouse. J.Exp.Zool. 115, 131 (1950)

IBSEN, H.L.: Prental growth in guinea-pigs with special reference to environmental factors affecting weight at birth. J.Exp.Zool. 51, 51 (1928)

INGALLS, Th.H., CURLEY, F.J.; PRINDLE, R.A.: Anoxia as a cause of fetal death and congenital defect in the mouse. Amer.J. Diseases of Children 80, 34-45 (1950)

- , AVIS, F.R., CURLEY, F.J., TEMIN, H.M.: Genetic determinants of hypoxia induced congenital anomalies. J. Heredity 44, 185 (1953)

INGRAM, D.L., MANDL, A.M., ZUCKERMAN, S.: The influence of age on litter size. J. Endocrin. 17, 280-285 (1958)

JENSH, R.P., BRENT, R.L., BARR, M.J.R.: The litter effect as a variable in teratologic studies of the albino rat. Am.J. Anat. 128, 185-192 (1970)

KENNEDY, G.C., PEARCE, W.M.: The relation between liver growth and somatic growth in the rat. J. Endocrin. 17, 149-157 (1958)

KENNEDY, T.G. and KENNEDY, J.P.: Effects of age and parity on reproduction in young female mice. J.Reprod.Fert. 28, 77-84 (1972)

KING, H.D.: Birth weight in the grey Norway rat and factors that influence it. Anat.Rec. 63, 335-354 (1935)

KÖHLER, E.: Untersuchungen über den Stoffwechsel während der Differenzierungsphase der Ratte und über die Beeinflußbarkeit durch Pharmaka. Habilitationsschrift FU Berlin 1970

KÖHLER, E., MERKER, H.-J., EHMKE, W., and WOJNOROWICZ, F.: Growth kinetics of mammalian embryos during the stage of differentiation. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 272, 169-181 (1972)

KOPEC, N.: zit. nach Hammond 1934, Anat. Rec. 27, 95 (1924)

KROWKE, R., PIELSTICKER, K., SIEBERT, G.: A simple fractionation procedure for studying incorporation of radioactively labelled precursors into mammalian main cell components. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 271, 121-124 (1971a)

- , SIEBERT, G., NEUBERT, D.: Biochemical screening test with ^{14}C-glucose and ^{32}P-phosphate for the evaluation of embryotoxic effects in vivo. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 271, 274-288 (1971b)

LICHTON, I.J.: Effects of ligation of uterine veins in pregnant rats. Am.J.Physiol. 205, 201-202 (1963)

LITTLE, W.A.: The significance of placental/fetal weight ratios. Amer. J. Obstet. Gynecol. 79, 134-137 (1960)

- : Significance of placental position in utero. Amer.J.Obstet. Gynecol. 90, 328-333 (1964)

LORKE, D.: Embryotoxische Wirkungen an der Ratte. Arch. Exptl. Pathologie 250, 360 (1964)

- : Zur Methodik der Untersuchungen embryotoxischer und teratogener Wirkungen an der Ratte. Arch. Exptl. Pathologie 246, 147 (1963)

LOVE, E.J., KINCH, R.A.H.: Factors influencing the birth weight in normal pregnancy. Amer. J. Obstet. Gynecol. 91, 342-347 (1965)

MAHESH, V.B.: Currect concepts on the regulation of ovulation and corpus luteum function. J. Reprod. Fert. 27, 297 (1971)

MAKOWSKI, E.L., MESCHIA, G., DROEGEMUELLER, W., BATTAGLIA, F.C.: Distribution of uterine blood flow in the pregnant sheep. Am. J. Obstet. Gynecol. 101, 409-412 (1968)

MAZZULLO, N.: Ginecologica 14, 437 (1948)

McCARTHY, J.C.: Genetic and environmental control of foetal and placental growth in the mouse. Anim. Prod. 7, 347 (1965)

- : The effects of inbreeding on the components of litter size in mice. Genet. Res. (Camb.) 10, 73-80 (1967)

- : Effects of litter size and maternal weight on foetal and placental weight in mice. J. Reprod. Fertil. 14, 507-510 (1967)

McLAREN, A., MICHIE, D.: Transmigration of unborn mice. Nature (Lond.) 174, 844 (1954)

- , - : The spacing of implantations in the mouse uterus. Memoirs of the Society for Endocrinology 6, 65 (1959a)

- , - : Experimental studies on placental fusion in mice. J. exp. Zool. 141, 47-73 (1959b)

- , - : Superpregnancy in the mouse. 1. Implantation and foetal mortality after induced superovulation in females of various ages. J. exp. Biol. 36, 281-300 (1959c)

McLAREN, A., MICHIE, D.: Superpregnancy in the mouse. 2. Weight gain during pregnancy. J. exp. Biol. 36, 301-314 (1959d)

- , - : Control of pre-natal growth in mammals. Nature 187, 363-365 (1960)

- : The distribution of eggs and embryos between sides in the mouse. J. Endocrin. 27, 157-181 (1963)

- : Genetic and environmental effects on foetal and placental growth in mice. J. Reprod. Fertil. 9, 79-98 (1965)

McKEOWN, Th., RECORD, R.G.: Observations on foetal growth in multiple pregnancy in man. J. Endocr. 8, 386-399 (1952)

- , - : The influence of placental size on foetal growth in man, with special reference to multiple pregnancy. J. Endocr. 9, 418-426 (1953)

MERKER, H.-J., WEDELL, J. und NEUBERT, D.: Biochemische und strukturelle Veränderungen an den Zellorganellen der Leber nach vollständiger Kreislaufunterbrechung. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 249, 85-116 (1964)

METCALFE, J., BARTELS, H., MOLL, W.: Gas exchange in the pregnant uterus. Physiol. Rev. 47, 782-838 (1967)

- : Uterine oxygen supply and fetal health. Yale Journal of Biol. and Medicine 166 (1970)

MINOT, J.: J. Physiol. 12, 97 (1891), zit. nach Eckstein 1955

MOLL, W., KÜNZEL, W.: Blood pressures in the uterine vascular system of anaesthesized pregnant guinea-pigs. Pflügers Arch. 330, 310-322 (1971)

MOSSMAN, H.W.: Comparative morphogenesis. Contr. Embryol. Carneg. Instn. 26, 129 (1937)

MURAKANI, U., KAMEYAMA, Y., KATO, T.: Effects of maternal anoxia upon development of embryos. Annual Report of the Research Institute of Environmental Medicine, Nagaya University, p. 75 (1955)

NAEYE, R.L.: The fetal and neonatal development of twins. Pediat. 33, 546-553 (1964)

- , BENIRSCHKE, K., HAGSTROM, J.W.C., MARCUS, C.C.: Intrauterine growth of twins as estimated from liveborn birthweight data. Pediat. 37, 409-416 (1966)

NEUBERT, D., MERKER, H.-J., KÖHLER, E., KROWKE, R., BARRACH, H.-J.: Biochemical Aspects of Teratology. In: Advances in the Biosciences 6. Schering Symposium on Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development, Venice, April 20 to 23, 1970. Editor Gerhard Raspé, Pergamon Press, Vieweg.

NEUBERT, D., PETERS, H., TESKE, S., KÖHLER, E., BARRACH, H.-J.: Studies on the problem of aerobic glycolysis occurring in mammalian embryos. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 268, 235-241 (1971)

NEUMANN, F.: Hormonale Regulation der Fortpflanzung bei Laboratoriums. nagern. Z. Versuchstierk. 12, 162-186 (1970)

NOYES, R.W., DOYLE, L.L., BENTLEY, D.L.: Effect of preimplantation development on foetal weight in the rat. J. Reprod. Fertil. 2, 238-245 (1961a)

- , DICKMANN, Z.: Survival of ova transferred into the oviduct of the rat. Fert. Steril. 12, 67 (1961b)

- , DOYLE, L.L., GATES, A.H., BENTLEY, D.L.: Ovular maturation and fetal development. Fertility and Sterility 12, 405-416 (1961c)

OERTER, D., BASS, R.: Effect of chloramphenicol infusion on the rate of synthesis of cytochrome oxidase in mammalian embryonic tissue. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 272, 239-242 (1972)

OGUR, M., ROSEN, G.: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. of Biochem. 24, 262-276 (1949)

OH, W., D'AMODIO, M.D., YAP, L.L., HOHENAUER, L.: Carbohydrate metabolism in experimental intrauterine growth retardation in rats. Amer. J. Obstet. Gynecol. 108, 415 (1970)

- , GUY, J.A.: Cellular growth in experimental intrauterine growth retardation in rats. J. Nutr. 101, 1631-1634 (1971)

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. 63, 152 (1943)

PARK, A.W.: Aspects of oral development in relation to litter size in rats. Acta anat. 70, 403-415 (1968)

- , NOWOSIELSKI-SLEPOWRON, B.A.J.: The effects of litter size on rat body growth. Acta anat. 79, 15-26 (1971)

PHILLIPS, S., DAWSON, B.: Circ. U.S.Dep. Agric. No. 538 (1940)

POTTER, R., CRUNDEN, G.: Amer. J. Obstet. Gynecol. 42, 870 (1941) Fetal weight in multiple pregnancy.

- , FULLER, N.: Amer. J. Obstet. Gynecol. 58, 139 (1949) Fetal weight, mortality in multiple pregnancy.

PRENSKY, A.L., MOSES, A., FISHMAN, M., TUMBLESON, M.E., DAFTARI, B.: The lipid composition of the cerebral hemisphere of the miniature pig (sus scrofa) during development. Comp. Biochem. Physiol. 39, 725-738 (1971)

REGEN, D.M.: The regulation of hexokinase and phosphofructokinase activity in heart muscle. J. biol. Chem. 239, 43-49 (1964)

ROSAHN, P.D., GREENE, H.S.N.: The influence of intrauterine factors on the foetal weights of rabbits. J. Exp. Med. 63, 901 (1936)

ROUX, J.F., VILLEE, C.A.: Effects of anoxia on the metabolism of the human placenta in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol. 80, 224-228 (1960)

- , TORDET-CORIDROIT, C., CHANEZ, C.: Studies on experimental hypotrophy in the rat. Biol. Neonate 15, 342-347 (1970)

- : Studies on cellular development in the suckling rat with intrauterine growth retardation. Biol. Neonate 18, 290-299 (1971)

RUNNER, M.N.: Differentiation of intrinsic and maternal factors governing intrauterine survival of mammalian young. J. exp. Zool. 116, 1 (1951)

SENGER, P.L., LOSE, E.D., ULBERG, L.L.: Reduced blood supply to the uterus as a cause for early embryonic death in the mouse. J. exp. Zool. 165, 337-344 (1967)

SCHMIDT, G., THANNHAUSER, S.J.: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. biol. Chem. 161, 83-89 (1945)

SZABO, A.J., GRIMALDI, R.D.: The metabolism of the placenta. In: Advances in Metabolic Disorders, Vol. 4, 185-228, herausgeg. von Rachmiel Levine und Rolf Luft, 1970, Academic Press (New York, London)

TORDET-CORIDROIT, C., ROUX, J., CHANEZ, C.: Etude du développement post-natal du rat né dysmature. C.R.Soc.Biol., Paris, Séance du 24 june 1969

TRASLER, D.G.: Influence of uterine site on occurrence of spontaneous cleft lip in mice. Science 132, 420 (1960)

WALDORF, D.P., FOOTE, W.C., SELF, H.L., CHAPMAN, A.B., CASIDA, L.E.: Factors affecting fetal pig weight late in gestation. J. Animal Sci. 161, 976 (1957)

WEDELL, J., MERKER, H.-J., NEUBERT, D.: Mitochondrienstruktur und Atmungskettenphosphorylierung im Herzmuskel nach vollständiger Kreislaufunterbrechung. Virchows Arch. path. Anat. 338, 355-370 (1965)

WERTHEMANN, A., REINIGER, U.: Über Augenentwicklungsstörungen bei Rattenembryonen durch Sauerstoffmangel in der Frühschwangerschaft. Acta anat. 11, 329-347 (1950)

WESTERMARK, E.: Fetal weight in multiple pregnancy. Acta obstet. scand. 4, 249 (1926)

WIEDEMANN, G.: Vergleichende Untersuchungen über Proteinsynthese in zellfreien Systemen aus Rattenleber und Rattenembryonen. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin 1972

WIGGLESWORTH, J.S.: Experimental growth retardation in the foetal rat. J. Path. Bact. 88, 1-13 (1964)

WINICK, G.: Cellular growth in intrauterine malnutrition. Ped. Clins. N. Am. 17, 69-78 (1970)

WINTERS, S., FEUFFEL, F.: Tech. Bull. Minn. Agric. Exp. Sta., No. 118 (1936)

WOOLLAM, D.H.M., MILLEN, J.W.: Influence of uterine position on the response of mouse embryo to the teratogenic effects of hypervitaminosis A. Nature 190, 184-185 (1961)

- , - : Influence of uterine position on the response of the mouse embryo to anoxia. Nature 194, 990-991 (1962)

WRIGHT, N.: Bull. U.S.Dep.Agric., No. 1090 (1922), zit. nach Eckstein 1955

ZONDEK, B.: Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens. Berlin, Springer 1935.

LEBENSLAUF

Geboren:	16. Mai 1945 in Berlin
Vater:	Dr. Heinrich Epping, Arzt
Mutter:	Marie-Luise Epping, geb. v. Viebahn
1951 - 1955	Besuch der 4. Grundschule in Berlin
1955 - 1964	Besuch des Canisius-Kollegs in Berlin (altsprachlicher Zweig)
13. 2. 1964	Reifeprüfung
SS 1964	Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin
28. 4. 1965	Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der FU Berlin
SS 1965	Albert-Ludwig-Universität in Freiburg im Breisgau
WS 1965/66 - WS 1969/70	FU Berlin
22. 9. 1966	Ärztliche Vorprüfung
1968, 1969	Engagement in universitären Gremien und Hochschulpolitik
27. 2. 1970	Staatsexamen
1. 4. 1970 - 31. 7. 1970	Medizinalassistent an der II. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Moabit
1. 8. 1970 - 30. 11. 1970	Medizinalassistent an der Chirurgischen Universitätsklinik, Krankenhaus Westend
seit 1. 12. 1970	Doktorand im Pharmakologischen Institut der FU, Abteilung Embryonalpharmakologie

DIFO–DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216